

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA LUISE VIOLA DE AZEVEDO

EXPRESSÃO TECIDUAL PULMONAR DE IL-17 E DE IL-8 E SUA
ASSOCIAÇÃO COM NEUTROFILIA EM PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO POR
PNEUMONIA VIRAL PANDÊMICA E NÃO PANDÊMICA

CURITIBA

2019

MARINA LUISE VIOLA DE AZEVEDO

EXPRESSÃO TECIDUAL PULMONAR DE IL-17 E DE IL-8 E SUA
ASSOCIAÇÃO COM NEUTROFILIA EM PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO POR
PNEUMONIA VIRAL PANDÊMICA E NÃO PANDÊMICA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Lucia de Noronha

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Azevedo, Marina Luise Viola de

Expressão tecidual pulmonar de IL-17 e de IL-8 e sua associação com neutrofilia em pacientes que foram a óbito por pneumonia viral pandêmica e não pandêmica . / Marina Luise Viola de Azevedo. – Curitiba, 2019.

65 p.: il.

Orientadora: Lucia de Noronha

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Víruses 2. Influenza A (H1N1) 3. Imunohistoquímica I. Título II. Noronha, Lucia de III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 576.64

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARINA LUISE VIOLA DE AZEVEDO** intitulada: **Expressão tecidual pulmonar de IL-17 e de IL-8 e sua associação com neutrofilia em pacientes que foram a óbito por pneumonia viral pandêmica e não pandêmica**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


CURITIBA, 28 de Junho de 2019.


LUCIA DE NORONHA
Presidente da Banca Examinadora


ANA PAULA MARTINS SEBASTIÃO
Avaliador Externo (UFPR)


VICTOR HORACIO DE SOUZA COSTA JUNIOR
Avaliador Externo (PUCPR)


ANA PAULA PERCICOTE
Avaliador Externo (UFPR)


CLEBER MACHADO DE SOUZA
Avaliador Externo (IPPP)

Dedicado à minha mãe, meu pai e meu irmão, família base, que junto comigo ansiou pela conquista acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **Elaine e Fernando** e ao meu irmão **Marcelo**, por estarem sempre ao meu lado, com muito incentivo e principalmente dedicação nos momentos que precisei de apoio.

À minha querida avó **Ingrid** por me fazer sentir importante e por toda a presença no meu desenvolvimento.

Às minhas filhas **Cecília** e **Laís**, que muito embora ainda crianças, foram fundamentais para que eu buscasse conquistar o melhor de mim.

Ao meu marido **Neto** pelo encorajamento constante.

Agradeço à **Dra. Lúcia de Noronha** não só por esta conquista, mas pela confiança, amizade e ensinamentos desde o início da minha jornada. Esteve ao meu lado durante toda a minha formação acadêmica superior e a quem devo minhas conquistas profissionais. Serei eternamente grata.

Aos amigos Colaboradores do Laboratório de Patologia Experimental, **Ana Paula, Seigo e Caroline** por toda a ajuda na preparação técnica, nas análises e na formatação do trabalho, além da amizade de longa data e da parceria de todos os dias.

À minha querida amiga-irmã **Geise** pela compreensão das minhas ausências, acompanhada de incentivo e comemoração nas conquistas.

À todos os meus professores, desde os primeiros anos de escola, até os que hoje me acompanham, por todo o aprendizado, formação e pela inspiração em ensinar.

Por fim, à Universidade que me abriu as portas para esta oportunidade e para estar sempre aprendendo.

“Erra aquele que não principia a aprender por supor que já é tarde”

Sêneca

RESUMO

As infecções agudas de vias aéreas representam uma causa mundialmente importante de morbimortalidade na infância. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) atestam que cerca de um terço da mortalidade mundial em crianças é causada por este tipo de infecção. Em abril de 2009, infecções causadas por um novo vírus influenza A H1N1 culminaram na primeira pandemia do século. O pH1N1 pdm09 difere do vírus da gripe sazonal na indução de respostas pró-inflamatórias em humanos e em modelos animais. Portanto, o objetivo desta tese foi de avaliar a expressão tecidual das interleucinas 17 e 8 (IL-17 e IL-8) e a contagem de neutrófilos em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por infecção pelo vírus pandêmico H1N1, e comparar com casos não pandêmicos. Para este fim, foram selecionados 10 casos cujas necropsias atestaram infecções respiratórias agudas graves ocasionadas por vírus pandêmico H1N1 (2009), e 67 casos de necropsias pediátricas cujas causas de óbito foram infecções respiratórias agudas virais graves não pandêmicas (2005). Foram incluídas, ainda, amostras de adultos (N=11) e crianças (N=19) que vieram a óbito por diversas causas, excluindo-se qualquer doença pulmonar. As amostras em blocos parafinados foram utilizadas na classificação histopatológica do dano pulmonar e na confecção de blocos de TMA. Em seguida foram realizadas as marcações de imunohistoquímica para os anticorpos em questão. Nas análises das lâminas observamos que o grupo pandêmico H1N1 apresentou porcentagens estatisticamente maiores das três variáveis: IL-8, IL-17 e contagem de neutrófilos, quando comparadas ao grupo não pandêmico. Os achados corroboram com a literatura, uma vez que em resposta a uma infecção viral, tanto a IL-8 quanto a IL-17 são secretadas por macrófagos e células T para recrutar demais células, dentre elas os neutrófilos. Sendo assim, o vírus H1N1, circulante e responsável pela pandemia de 2009, parece ter uma alta virulência provocando uma resposta exacerbada do sistema imunológico do hospedeiro, e essa pode ser a chave para a gravidade da lesão.

Palavras-chave: Infecções virais agudas 1. H1N1 2. imunohistoquímica 3.

ABSTRACT

Acute airway infections are a worldwide cause of childhood morbidity and mortality. Data from the World Health Organization (WHO) show that about one-third of the world's child mortality is caused by this type of infection. In April 2009, infections caused by a new influenza A H1N1 virus culminated in the first pandemic of the century. The pH1N1 pdm09 differs from the seasonal influenza virus in inducing proinflammatory responses in humans and animal models. Therefore, the aim of this thesis was to evaluate the tissue expression of interleukins 17 and 8 (IL-17 and IL-8) and neutrophil count in lung samples from patients who died of H1N1 pandemic virus infection, and to compare with non-pandemic cases. To this end, we selected 10 cases whose necropsies recorded severe acute respiratory infections caused by the H1N1 pandemic virus (2009), and 67 cases of pediatric necropsies whose causes of death were acute non-pandemic acute viral respiratory infections (2005). We also included samples of adults (N = 11) and children (N = 19) who died for various causes, excluding any lung disease. The samples in paraffin blocks were used in the histopathological classification of lung damage and in the manufacture of TMA blocks. Immunohistochemistry markers were then performed for the antibodies cited. In the analysis of the slides, we observed that the H1N1 pandemic group had statistically higher percentages of the three variables: IL-8, IL-17 and neutrophil counts when compared to the non-pandemic group. The findings corroborate with the literature, since in response to a viral infection, both IL-8 and IL-17 are secreted by macrophages and T cells to recruit other cells, including neutrophils. Thus, the circulating H1N1 virus responsible for the 2009 pandemic appears to have a high virulence leading to an exacerbated response of the host's immune system, and this may be the key to the severity of the lesion.

Keywords: Acute viral infections 1. H1N1 2. Immunohistochemistry 3.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ARTIGO 1: REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA AMOSTRAS VÍRUS-POSITIVO X VÍRUS-NEGATIVO	34
FIGURA 1 - ARTIGO 2: A EXPRESSÃO TECIDUAL DE IL-8, IL-17 E O NÚMERO DE NEUTRÓFILOS DO GRUPO CONTROLE BASAL	47
FIGURA 2 - ARTIGO 2: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DE IL-8, IL-17 E NÚMERO DE NEUTRÓFILOS ENTRE O GRUPO H1N1 PANDÊMICO E O GRUPO CONTROLE BASAL ADULTO	48
FIGURA 3 - ARTIGO 2: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DE IL-8, IL-17 E NÚMERO DE NEUTRÓFILOS ENTRE O GRUPO NÃO PANDÊMICO E O GRUPO CONTROLE BASAL CRIANÇA.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ARTIGO 1: CARACTERÍSTICAS BASAIS DA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO À CLASSIFICAÇÃO EM DOIS GRUPOS CONSIDERANDO A PRESENÇA VIRAL.....	34
TABELA2 - ARTIGO 1: TIPOS DE VÍRUS ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO ESTUDADA EM RELAÇÃO À EXPRESSÃO TECIDUAL DA IL-17.....	36
TABELA 3 - ARTIGO 1: CARACTERÍSTICAS BASAIS DA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO AO PADRÃO DE IL-17.....	37
TABELA 1 - ARTIGO 2: COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS PANDÊMICOS H1N1 E NÃO-PANDÊMICOS DE ACORDO COM OS ACHADOS CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS.....	47
TABELA 2 - ARTIGO 2: COMPARAÇÃO DOS CASOS DE GRUPOS PANDÊMICOS H1N1 COM GRUPOS NÃO PANDÊMICOS SUBDIVIDIDOS EM DOIS GRUPOS COM E SEM A PRESENÇA DO VÍRUS INFLUENZA.....	49
TABELA 3 - ARTIGO 2: COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS PANDÊMICOS H1N1 E NÃO-PANDÊMICOS COM ATÉ 7 DIAS DE SOBREVIVÊNCIA RELACIONADOS À EXPRESSÃO DE IL-8, IL-17 E CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

OMS	- Organização Mundial da Saúde
UNICEF	- Fundo para as Nações Unidas para a Infância
CDC	- Centro de Controle e Prevenção de doenças dos Estados Unidos
MHC	- Complexo de Histocompatibilidade
INF- γ	- Interferon Gama
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
ADv	- Adenovírus
RSV	- Vírus Sincicial Respiratório
FLUA	- Influenza A vírus
FLUB	- Influenza B vírus
PI1	- Parainfluenza 1 virus
PI2	- Parainfluenza 2 virus
PI3	- Parainfluenza 3 virus
Th1	- Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	- Linfócito T <i>helper</i> 2
IL-2	- Interleucina 2
IL-8	- Interleucina 8
IL-17	- Interleucina 17
pH1N1	- vírus H1N1 pandêmico
IHQ	- Imunohistoquímica
SARS	- Síndrome respiratória aguda grave
RT-qPCR	- Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real
TMA	- <i>Tissue MicroArray</i>
HE	- Hematoxilina-eosina

LISTA DE SÍMBOLOS

© - copyright

@ - arroba

® - marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
1.2	OBJETIVOS	17
1.2.1	Objetivo geral	17
1.2.2	Objetivos específicos.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	A INFECÇÃO AGUDA GRAVE DE VIAS AÉREAS INFERIORES DE ETIOLOGIA VIRAL E NÃO VIRAL.....	19
2.2	A RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA E OS AGENTES VIRAIS.....	20
2.3	O VÍRUS H1N1.....	21
2.4	INTERLEUCINAS E NEUTRÓFILOS.....	22
2.4.1	IL-8.....	22
2.4.2	IL-17.....	23
2.4.3	Neutrófilos	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	30
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
6	CONCLUSÃO.....	56
7	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	63

1 INTRODUÇÃO

As infecções agudas de vias aéreas representam uma causa mundialmente importante de morbidade e mortalidade na infância, particularmente nos países em desenvolvimento (Stralio *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2001). As infecções agudas de vias áreas inferiores graves (pneumonias), principalmente as que acometem a faixa etária inferior aos 5 anos de idade, são as maiores determinantes dessa mortalidade (Rudan *et al.*, 2013).

A pneumonia é a maior causa infecciosa de morte no mundo e que no ano de 2015, foi responsável por 15% das mortes em crianças menores de cinco anos na América do Norte (Cilloniz *et al.*, 2016). Na Europa, a mortalidade por esta causa varia amplamente entre os países, sendo de 1 a 48% as taxas de mortalidade por pneumonia adquirida na comunidade (Welte *et al.*, 2012).

Nos países em desenvolvimento, as pneumonias na infância não são apenas comuns, mas também graves, causando grande mortalidade (WHO, 2006). Os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que, na última década, cerca de um terço da mortalidade mundial em crianças (4 a 5 milhões de óbitos anuais) foi causada por infecções respiratórias agudas graves de vias aéreas inferiores. O Fundo para as Nações Unidas para a Infância (UNICEF) estima que mais de 3 milhões de crianças morrem de pneumonia a cada ano, predominantemente nos países em desenvolvimento (UNICEF, 2018).

Existem, em circulação no mundo, diferentes vírus causadores de infecções das vias aéreas, muitos deles já são conhecidos, contra os quais são produzidas vacinas anuais para proteger a população mais suscetível (Katsurada *et al.*, 2017). Ainda assim, em 2009 uma cepa do, já conhecido, influenza A causou um amplo número de infecções, as quais se iniciaram no México, se entenderam para os Estados Unidos e acabaram por se espalhar para outros países gerando a primeira pandemia do século (Bhatnagar *et al.*, 2013).

De acordo com centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos (CDC), esta pandemia durou de março de 2009 a abril de 2010 (Shrestha *et al.*, 2011). Dentre os casos acometidos pelo vírus pandêmico naquele ano, o que chamou a atenção foi a faixa etária mais predominante, a de adultos jovens, que geralmente são os imunocompetentes menos suscetíveis a esses vírus (Louie *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009; Dominguez-Cherit *et al.*, 2009). Por essa razão, as

hipóteses sobre as conseqüências da infecção pelo vírus pandêmico se voltaram para a resposta imune, que poderia estar associada à gravidade da infecção (Peiris *et al*, 2010).

1.1 JUSTIFICATIVA

O estudo sobre as interleucinas e células envolvidas na resposta do hospedeiro às infecções virais que acometem o trato respiratório, e causam pneumopatias graves, pode ter um papel chave na compreensão dessas infecções e na prevenção de epidemias desta natureza.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão tecidual das interleucinas 8 e 17 e correlacionar com a presença de neutrófilos em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumopatia grave ocasionada por vírus pandêmico H1N1.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização das amostras estudadas de acordo com o gênero, faixa etária e padrão histopatológico da doença;
- Realizar uma avaliação da expressão imunohistoquímica tecidual das interleucinas 8 e 17 em amostras pulmonares parafinadas de pacientes acometidos por infecções respiratórias agudas virais graves causadas por vírus pandêmico H1N1.
- Comparar a expressão tecidual das interleucinas 8 e 17 nas amostras acima com as amostras pulmonares de pacientes com pneumonias graves não pandêmicas, causadas por outros vírus respiratórios.
- Comparar a expressão tecidual de IL-8 e IL-17 das amostras do grupo H1N1 com o grupo controle basal adultos
- Comparar a expressão tecidual IL-8 e IL-17 das amostras do grupo não pandêmico com o grupo controle basal crianças.

- Comparar a expressão tecidual das interleucinas 8 e 17 das amostras do grupo H1N1 com as amostras do grupo não pandêmico subdivididas em dois grupos: grupo influenza (FLUA, FLUB) e grupo não-influenza (RSV, ADv, PIV 1, 2 e 3).

- Correlacionar a expressão tecidual das interleucinas 8 e 17 com a presença de neutrófilos teciduais, tanto no grupo pandêmico (H1N1) quanto no grupo não-pandêmico, em uma tentativa de relacionar a expressão destas interleucinas com a sua efetividade em recrutar neutrófilos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As doenças infecciosas do trato respiratório inferior são responsáveis por 90% das mortes por doença respiratória, e determinam 10% de mortes por todas as causas em crianças menores de um ano (Kaneko *et al.*, 2002). No Brasil, as pneumonias agudas graves são responsáveis por 11% das mortes em crianças com idade inferior a um ano, e por 13% na faixa etária entre um e quatro anos, sendo a causa mais comum as de etiologia viral e bacteriana (Stralio *et al.*, 2002).

Assim, a busca de biomarcadores teciduais ou sanguíneos que permitam a detecção de indivíduos mais prováveis de desenvolver infecção respiratória aguda grave de vias aéreas inferiores de origem viral, seguida de óbito, é fundamental para a prevenção desta doença e de sua morbimortalidade. Pode ser útil ainda na instauração de terapêutica mais precoce, mais agressiva e individualizada para pacientes susceptíveis ao desfecho fatal ou a internações prolongadas seguidas de seqüelas respiratórias.

2.1 A INFECÇÃO AGUDA GRAVE DE VIAS AÉREAS INFERIORES DE ETIOLOGIA VIRAL E NÃO VIRAL

As infecções respiratórias agudas graves de vias aéreas inferiores têm como seus principais agentes etiopatogênicos os vírus e as bactérias. As pneumonias virais ou bacterianas podem ser consequência de infecções que se originam no próprio trato respiratório superior, progredindo, por contiguidade ou por contaminação por meio de aerossóis até atingirem o trato respiratório inferior (bronquíolo terminal e alvéolos), como ocorre, por exemplo, nas infecções respiratórias por influenza e parainfluenza, além de vírus sincicial respiratório e adenovírus. Estudos sobre a patogênese das pneumonias demonstram dois padrões anatomopatológicos básicos de lesão de vias aéreas inferiores. As pneumonias causadas por vírus geralmente mostram um padrão lesional chamado de pneumonite intersticial, acometendo pneumócitos como alvo primário, e cursando com dano alveolar difuso. Em uma fase mais avançada, este padrão lesional cursa com organização fibrosa intra-alveolar, septal e bronquiolar e com presença de histiócitos e pneumócitos multinucleados. Já as infecções bacterianas geralmente cursam com um padrão broncopneumônico de lesão, o qual se caracteriza como presença de neutrófilos nas luzes alveolares e a

quase ausência de fibrose durante o processo de resolução da doença (Knott *et al.*, 1994).

2.2 A RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA E OS AGENTES VIRAIS

A resposta imunológica celular, observadas nas infecções agudas graves de vias aéreas inferiores de origem viral, pode-se observar que linfócitos T CD4+ expressam MHC de classe I e II, gerando respostas via linfócitos T CD8+, chamados citotóxicos, e produção de IFN- γ e TNF, induzindo a lise de células infectadas e apoptose (Chang & Braciale, 2002; Claasen, 2007).

O quadro clínico de maior gravidade é associado às elevadas cargas virais. Entretanto anticorpos neutralizantes parecem exercer um efeito protetor contra as formas graves (Bueno *et al.*, 2008). Ainda na pneumonia grave, tem sido observada intensa replicação viral local, resposta pró-inflamatória exacerbada e um alto nível de ativação das linfócitos T (Shann, 1986).

São tradicionalmente conhecidos como causadores de pneumonia os vírus influenza A e B; parainfluenza 1, 2 e 3; RSV; e adenovírus (Mcintosh, 2002; Nakatani *et al.*, 2001). Diversos autores têm estudado a resposta imunológica em pneumonias virais agudas, sendo que os padrões de resposta parecem estar relacionados a gravidade das lesões pulmonares (Bruder *et al.*, 2006).

Sabe-se que os vírus respiratórios são capazes de levar a uma hiper-responsividade das vias aéreas ativando tanto as respostas de linfócitos T auxiliares ou *helper* 1 (Th1) como *helper* 2 (Th2). Alguns trabalhos relacionaram a infecção viral pelo vírus sincicial respiratório e a resposta imunológica desencadeada, mostrando que a resposta Th1 é de fundamental importância na patogênese da doença (Takala *et al.*, 1993; Thorburn *et al.*, 2006). Outros autores (Chang *et al.*, 2002) por sua vez, demonstraram que o vírus sincicial respiratório inibe a expressão de linfócitos TCD8+ no parênquima pulmonar, bem como o desenvolvimento de linfócitos T CD8+ de memória, isto porque o vírus sincicial respiratório parece interferir na sinalização dos receptores destas células.

Além disso, determinados autores (Hirose *et al.*, 2008) citaram a interação entre o vírus sincicial respiratório e linfócitos T, que levaria à menor produção de citocinas no pulmão, de maneira a suprimir linfócitos T CD4+, resultando em um ciclo de resposta inflamatória, dano pulmonar e doença aguda severa mediada pela

resposta imune Th1 (Estripeaut *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009; Chang & Braciale, 2002).

O vírus sincicial respiratório, por exemplo, poderia prejudicar a ativação de linfócitos T CD4+, levando à supressão da proliferação de linfócitos T, especificamente os CD 8+. O Adenovírus, por exemplo, pode levar à supressão da proliferação de células dendríticas pulmonares primárias, fazendo com que os linfócitos T CD4+ se tornem irresponsáveis a interleucina-2 (IL-2) em culturas primárias (Chung *et al.*, 2008). A partir desta irresponsividade à IL-2, alguns autores (Hirose *et al.*, 2008; Shimojo *et al.*, 2008; Tasker *et al.*, 2008) sugeriram que o Adenovírus pode levar a um estado de incompetência imunológica pulmonar, podendo contribuir para o desenvolvimento de pneumonias com padrão anatomopatológico diferente do habitual e também de afecções pós-virais, tais como pneumonias virais complicadas por infecção bacteriana.

Existem vários tipos de citocinas que tem propriedades pró e anti-inflamatórias e são participantes importantes na fase aguda da infecção e em respostas imunológicas do organismo. Em vista disto, o padrão de secreção das interleucinas pode variar de paciente para paciente e também entre os tipos virais.

2.3 O VÍRUS H1N1

Os vírus da gripe, membros da família Orthomyxoviridae, são importantes patógenos respiratórios que podem causar casos esporádicos, epidemias sazonais e pandemias periódicas que impactam severamente na saúde humana e na economia.

Em abril de 2009, um novo vírus influenza A do subtipo H1N1 foi identificado em pacientes no México e Estados Unidos e dentro de um curto período de dois meses tornou-se a primeira pandemia do século (Bhatnagar *et al.*, 2013).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a pandemia causou um estimado de 61 milhões de casos sintomáticos, 274 mil internações, e 12.500 mortes apenas nos Estados Unidos de abril de 2009 a abril 2010 (Shrestha *et al.*, 2011). Mesmo após a declaração do fim da pandemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em agosto de 2010, o H1N1 continua a circular em todo o mundo causando um substancial número de internações e mortes (MMWR 2009).

A maioria das mortes associadas ao H1N1 ocorre em crianças, jovens adultos, mulheres grávidas e em indivíduos com doenças crônicas. O vírus pH1N1 (pandemic H1N1) tem características clínico-patológicas distintas, e tem sido também associado com encefalopatia, outras manifestações neurológicas e miocardite (Glaser *et al.*, 2012).

O H1N1 difere do vírus da gripe sazonal na indução de respostas pró-inflamatórias em humanos e em modelos animais (Itoh *et al.*, 2009). Estas diferenças e a continuidade da circulação mundial do vírus tem destacado a necessidade de aprofundar o estudo do tropismo tecidual do vírus e a patogênese da doença.

Alguns estudos relataram achados patológicos em casos humanos usando histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) (Nakajima *et al.*, 2012). A IHQ pode fornecer conhecimentos em patogênese e tropismo tecidual do vírus demonstrando a presença de antígenos virais nos tecidos (Shieh *et al.*, 2010).

2.4 INTERLEUCINAS E NEUTRÓFILOS

2.4.1 IL-8

A interleucina 8 (IL-8, CXCL8) é uma citocina que possui atividade quimiotática para leucócitos específicos, dentre eles o neutrófilo. Ela é produzida principalmente por macrófagos, fibroblastos, linfócitos, células endoteliais e células musculares lisas (Meniailo *et al.*, 2018). Sua produção não parece ser constitutiva, mas induzida por outras citocinas de caráter pró-inflamatório ou ainda pelo contato com produtos bacterianos, vírus e produtos virais (Mukaida, 2003).

Evidências indicam que a IL-8 está envolvida em processos de migração de leucócitos nos tecidos. Ela é internalizada por células endoteliais e liberada para contato com neutrófilos da corrente sanguínea, promovendo sua adesão à matriz, estimulando a migração através do endotélio e do epitélio pulmonar (Mukaida, 2003; Kobayashi, 2008).

Essa citocina tem sido bastante estudada quanto a sua presença em doenças pulmonares. Os macrófagos alveolares do epitélio pulmonar são uma importante fonte de quimiocinas e produzem a IL-8 (Grommes & Soehnlein, 2011) que é um potente ativador e quimioatrativo de neutrófilos e juntos parecem ser os

maiores responsáveis pela inflamação e conseqüentemente pela lesão pulmonar (Allen & Kurdowska, 2014). Um estudo ainda demonstrou que a presença de IL-8 foi responsável pela supressão da apoptose de neutrófilos (Dunican *et al.*, 2000).

O bloqueio da IL-8 em modelos animais com injúria pulmonar aguda resultou em uma substancial redução da lesão pulmonar. Isso se deve provavelmente pela ausência de neutrófilos geralmente recrutados pela IL8 (Grommes & Soehnlein, 2011).

2.4.2 IL-17

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória derivada principalmente de linfócitos T ativados e tem sido associada à inflamação neutrofílica das vias aéreas (Weihler *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2012; Barlow *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2010). A IL-17 exerce efeitos nas células epiteliais humanas, incluindo a estimulação da produção de IL-8, a qual contribui para exacerbar o recrutamento de neutrófilos induzidos pela IL-17 (Weihler *et al.*, 2007).

Os números de linfócitos T expressando IL-17 estão aumentados principalmente em vias aéreas de pacientes com asma. Os níveis de IL-17 costumam ser detectados na expectoração de pacientes com asma e bronquite crônica, correlacionando-se a hiperreatividade das vias aéreas (Weihler *et al.*, 2007; Barlow *et al.*, 2011).

Infecções por vírus do grupo Parainfluenza geram um aumento aberrante da produção de certas citocinas pelas células infectadas, porém, cultivos celulares de fibroblastos pulmonares infectados com o vírus não apresentaram nenhuma alteração significativa na produção de IL-17 (Yoshizumi *et al.*, 2010)

Um estudo em modelo animal infectado com a cepa pandêmica do vírus *Influenza A H1N1* observou que a deficiência de receptores de IL-17 (IL17-RA) está associada a maiores taxas de sobrevivência nestes animais (Crowe *et al.*, 2009), isso provavelmente ocorre devido à capacidade de IL-17 induzir a produção de diversas quimiocinas como IL-8, o que resulta no recrutamento de neutrófilos até os focos infecciosos (Lann *et al.*, 2002; Crowe *et al.*, 2009; Lidén *et al.*, 2000; Kawagushi *et al.*, 2004).

Infecções por Influenza A parecem apresentar uma neutrofilia importante (Tumpey *et al.*, 2005), e o recrutamento excessivo de neutrófilos para as vias aéreas

induzido por IL-17 leva a danos teciduais, os quais são bastante significativos do ponto de vista clínico, podendo até mesmo levar a óbito (Lidén *et al.*, 2000).

Na tentativa de elucidar a pandemia de H1N1 ocorrida em 2009, um estudo utilizou ratos knockout para IL-17 como modelo, os quais apresentaram níveis mais elevados desta interleucina em comparação aos animais com expressão normal para IL-17, demonstrando ter um papel fundamental em infecções por Influenza A através do recrutamento e acúmulo de neutrófilos (Chenggang *et al.*, 2009).

2.4.3 Neutrófilos

Os neutrófilos são os mais numerosos leucócitos circulantes e a primeira linha de defesa contra patógenos e, por isso, estão associados à imunidade inata (Nemeth & Mocsai, 2012). São células prontamente recrutadas para os tecidos após lesão, com ou sem infecção, por fatores quimiotáticos, dentre eles IL-8 e IL-17. Como essas células são recrutadas durante a fase aguda da infecção, pela secreção de mediadores como as quimiocinas e interleucinas, a presença deles pode ser um indicativo de que os mediadores relacionados ao seu recrutamento, estão executando a função esperada.

Equipados com diversos receptores de superfície celular para o reconhecimento de patógenos e inflamação, os neutrófilos são efetores que destroem microorganismos patogênicos e lesionam tecidos afetados através da produção de diversos fatores de defesa, como espécies reativas do oxigênio, peptídeos antimicrobianos e proteases, muitos com potencial para determinar mais lesão tecidual (Bratton & Henson, 2011; Grommes & Soehnlein, 2011, Nemeth & Moscai, 2016).

Os neutrófilos começam a chegar ao local de infecção/inflamação minutos após a lesão e podem persistir por vários dias antes de serem fagocitados por macrófagos. Durante este período são importante fonte de citocinas pró-inflamatórias (Parkos, 2016). Eles são continuamente reabastecidos na corrente sanguínea durante a homeostase e sua provisão é aumentada durante uma infecção ou lesão significativa. Sua remoção homeostática da circulação coincide com sua produção e é mediada por macrófagos e estroma da medula óssea (Bratton & Henson, 2011).

No sistema respiratório, a migração de um grande número de neutrófilos está associada a uma infinidade de infecções pulmonares, bronquite crônica e respostas alérgicas (Parkos, 2016).

Doenças respiratórias causadas por infecção viral apresentam uma relação estreita com a presença de neutrófilos e a lesão tecidual causada por eles. Há indícios de que a morte de pacientes na fase aguda da síndrome respiratória aguda grave (SARS) é caracterizada por uma resposta inflamatória pulmonar crítica acompanhada do acúmulo maciço de neutrófilos, aumento da permeabilidade vascular e alta produção de citocinas e quimiocinas (Ichikawa *et al.*, 2013).

Estudos com animais infectados com cepas do vírus influenza A H1N1 demonstraram um recrutamento aumentado de neutrófilos após infecção, sugerindo respostas exacerbadas que contribuem para a doença durante infecções graves (Tate *et al.*, 2011).

Segundo Cheng & Palaniyar (2013) os neutrófilos são encontrados em concentrações mais elevadas nos capilares pulmonares do que no tecido sanguíneo, mesmo na ausência de estímulos inflamatórios, o que permite a migração rápida para os pulmões em caso de lesão. Em um modelo animal de infecção pelo influenza, amostras de lavado broncoalveolar mostraram um predomínio de neutrófilos em relação a macrófagos e monócitos e indicando que a ativação de um grande número dessas células pode contribuir para a patogênese da infecção viral grave ou fatal (Wang *et al.*, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa humana do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sob o número 2.426.757.

3. 1 Amostras do Experimento e Controles

Os casos do **Grupo Pandêmico H1N1** compreendem amostras pulmonares provenientes de necropsias de pacientes, cuja causa da morte foram infecções respiratórias agudas graves ocasionadas por vírus pandêmico H1N1 (n=10) durante a pandemia de 2009. A faixa etária dos pacientes variou de 21 a 61 anos de idade, incluído ambos os gêneros. A comprovação da infecção por H1N1 foi feita pelo método da PCR em todos os 10 pacientes deste estudo. Para a genotipagem do Influenza A em (H1N1)pdm09, nós utilizamos a RT- qPCR (Reação da **transcriptase reversa, seguida** de reação em cadeia da polimerase em Tempo Real). A amplificação do genoma viral foi realizada com o Kit Invitrogen *SuperScriptTMIII Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR*, que é capaz de sintetizar e amplificar o cDNA em um mesmo protocolo e utiliza como fluorocromo a sonda *TaqMan®* ligada ao fluoróforo FAM - sistema de fluorescência específico do tipo sonda por hidrólise, protocolo fornecido pelo CDC/2009.

Para os casos do **Grupo Não Pandêmico**, foram utilizadas amostras pulmonares provenientes de necropsias de pacientes pediátricos, cuja causa da morte foram infecções respiratórias agudas virais graves não pandêmicas (n=67). A partir de 794 casos de necropsias pediátricas com doença respiratória grave (entre os anos de 1960 a 2004), foram selecionados 193 casos para este estudo, os quais apresentavam blocos em parafina que continham amostras de pulmão em boas condições para reação imunohistoquímica. Todos os casos foram testados para vírus respiratórios através do mesmo protocolo de imunohistoquímica abaixo descrito, com os anticorpos monoclonais antivírus Sincicial Respiratório (VSR), anti-adenovírus (Adv), anti-parainfluenza 1, 2 e 3 (PIV1, PIV2, PIV3) e anti-influenza A e B (FLUA e FLUB) da LIGHT DIAGNOSTICSTM Respiratory Viral Screen DFA Kit (CHEMICON International, Inc., Temecula, USA). Destes 193 casos testados, 68 foram positivos para um ou mais vírus respiratórios, sendo que 67 deles foram

utilizados para compor o grupo não pandêmico deste estudo. A faixa etária deste grupo variou de um mês até 14 anos de idade, incluindo ambos os gêneros^{14, 15, 16}.

Para ambos os grupos, pandêmico H1N1 e não pandêmico, foi realizada pesquisa direta aos laudos das necropsias e as datas dos óbitos foram registradas bem como o gênero e a idade dos pacientes. As datas dos óbitos foram utilizadas para definir a sazonalidade, que foi dividida em meses quentes e frios. A sobrevivência foi definida como o período compreendido entre o internamento/diagnóstico e o óbito^{14, 15, 16}.

Os padrões anatomopatológicos encontrados nas amostras deste estudo foram revisados em lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE) e foram classificados em: padrão A – broncopneumonia e padrão B – pneumonite intersticial. Os mesmos cortes em HE também foram usados para a localização das áreas amostrais que foram utilizadas para construção de blocos parafinados multiamostrais (TMA) com quatro amostra por caso, sendo elas, 2 áreas peribrônquicas e 2 periféricas subpleurais. Os blocos em TMA foram utilizados para realizar as reações imunoistoquímicas^{14, 15, 16}.

Com o intuito de verificar a concentração tecidual das interleucinas (IL-8 e IL-17), bem como as contagens teciduais de neutrófilos em amostras de pulmão sem alterações anatomopatológicas, foram construídos TMAs de outros dois grupos controles: o **Grupo Controle Basal Adultos** (n=11) e o **Grupo Controle Basal Crianças** (n=19). Estes grupos foram separados e avaliados da mesma maneira acima descrita para os grupos pandêmico H1N1 e não pandêmico, e são compostos por amostras pulmonares provenientes de necropsias de pacientes que vieram a óbito por causas diversas, não envolvendo a presença de lesões pulmonares^{14, 15, 16}. A faixa etária do Grupo Controle Basal Crianças variou de 2 meses a 13 anos com ambos os gêneros distribuídos de forma homogênea, enquanto do Grupo Controle Basal Adultos de 18 anos a 60 anos, com predomínio de amostras provenientes de pacientes do gênero masculino, seguindo a regra do grupo de estudo H1N1.

Para os efeitos de comparação dos resultados de expressão tecidual de IL-8 e IL-17 e da contagem tecidual de neutrófilos, o grupo não pandêmico também foi subdividido conforme a presença ou ausência de imunopositividade para vírus FLUA e FLUB (**Grupo Com Vírus Influenza**, n=23 e; **Grupo Sem Vírus Influenza**, n=44). Sendo assim, o grupo com vírus *Influenza* compreende as amostras que foram imunopositivas para FLUA e FLUB e o grupo sem vírus *Influenza* compreende as

amostras que foram identificadas com outros tipos virais, tais como RSV; AdV; PIV1; PIV2; PIV3.

3. 2 Ensaio imunohistoquímico

A identificação das Interleucinas 8 e 17 nas amostras parafinadas dispostas em TMA se deu por meio da técnica de imunohistoquímica, onde foram utilizados anticorpos primários contra as proteínas em questão (anti-IL-8 anticorpo policlonal de coelho, Abcam, Cambridge, UK , diluição 1:200 e anti IL-17 anticorpo policlonal de coelho, Abcam, Cambridge, UK, diluição 1:200). O protocolo de imunohistoquímica utilizou incubação dos anticorpos primários em câmara úmida, com temperatura entre 2 e 8° C, overnight. O polímero secundário (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, CA, USA) foi incubado com o material por 25 minutos em temperatura ambiente. Para a revelação, foi adicionado complexo 2, 3, dimino-benzidina + substrato peróxido de hidrogênio, por 3 minutos e após realizado a contra-coloração com hematoxilina de Harris.

3. 3 Análises das Interleucinas 8 e 17

As lâminas de TMA imunocoradas foram submetidas ao scanner de lâminas Axio Scan.Z1 da marca Zeiss, em aumento de 40 vezes e a expressão tecidual dos biomarcadores estudados foi medida em porcentagem por campo de grande aumento em 16 campos, determinada pelo programa de análise morfológica Image Pro Plus ® 4.5 (Media Cybernetics ® - Rockville, Maryland, USA) ^{14,15, 16}.

3. 4 Contagem de neutrófilos

A partir dos blocos de TMA, foram confeccionadas lâminas com coloração de Hematoxilina-Eosina e em seguida submetidas ao scanner de lâminas Axio Scan.Z1 da marca Zeiss, em aumento de 40 vezes, com a finalidade de gerar imagens em alta resolução para efetuar a contagem de neutrófilos. As imagens foram selecionadas de acordo com as áreas de maior concentração de neutrófilos na amostra, sendo obtidas 10 imagens por caso. A contagem foi realizada utilizando o software no scanner Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss -Oberkochen, Alemanha), onde

cada célula encontrada foi marcada para posterior checagem. Foram contabilizados os neutrófilos que se encontravam apenas no septo alveolar. Ao final, obteve-se a média do número de células de cada amostra, com o propósito de se realizar a análise estatística comparativa entre os grupos estudados.

3. 5 Análise estatística

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo. Para variáveis categóricas foram apresentadas frequências e percentuais. A comparação de dois grupos, em relação a variáveis quantitativas, foi realizada usando-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para analisar a associação entre duas variáveis quantitativas foi estimado o coeficiente de correlação de Spearman. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Este trabalho visa identificar a possível influência da interleucina 17 na lesão tecidual pulmonar causada pela infecção pelo vírus Influenza A H1N1, cepa da pandemia de 2009.

Dessa forma, esta pesquisa foi dividida em duas partes. Inicialmente produzimos um trabalho sobre a expressão tecidual pulmonar de interleucina 17 em pacientes que foram a óbito por pneumonias virais causadas por vírus sazonais não pandêmicos em 2005. Este estudo está relatado no primeiro artigo desta tese, o qual já foi submetido para *International Journal of Molecular Sciences* (IJMS).

Em um segundo momento, o papel das interleucinas 8 e 17 e a presença de neutrófilos foi avaliado nas amostras teciduais pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumonia causada por influenza A H1N1 em 2009. Neste segundo artigo, as análises da interleucina 8 e a contagem de neutrófilos foram somadas as análises da expressão de interleucina 17 a fim de melhor avaliar a efetividade desta última como recrutadora de polimorfonucleares (neutrófilo). Além disso, os resultados obtidos com a população estudada no primeiro artigo foram comparados com os resultados obtidos nas amostras do grupo H1N1. Este segundo artigo está em fase final de redação.

Desta forma, esta tese será apresentada sob a forma dos dois referidos artigos:

4.1 Artigo 1

Artigo submetido à revista International Journal of Molecular sciences:

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: International Journal of Molecular Sciences

Manuscript ID: ijms-502466

Type of manuscript: Article

Authors: Marina Azevedo, Mineia Malaquias, Caroline Vaz de Paula, Cleber Souza, Victor Costa Junior, Sonia Raboni, Renata Halila, Giuliana Rosendo, Priscilla Gozzo, Lucia Noronha *

Received: April, 27 2019

O Papel da IL-17 e Lesões Pulmonares em Crianças com Pneumonia Viral Aguda Letal Não-Pandêmica

Marina Luise Viola Azevedo, BS, MSc^a; Mineia Alessandra Scaranello Malaquias, MsC, PhD^b; Caroline Busatta Vaz de Paula, BS, MSc^b; Cleber Machado de Souza, PhD^a; Victor Horácio Costa Júnior, MD, MSc, PhD^a; Sonia Maria Raboni MD, MSc, PhD^c; Renata Halila, BS^b; Giuliana Rosendo, MD^b; Priscilla Gozo, MD; Lucia de Noronha, MD, MSc, PhD^{b*}

^a Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Universidade Federal do Paraná

^b Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

^c Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

* Correspondência: Lúcia de Noronha. Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho Curitiba - Paraná, Brasil.

E-mail: lnno.noronha@gmail.com

Resumo: Um grande número de citocinas parece desempenhar papel importante em processos inflamatórios agudos que levam ao remodelamento pulmonar e à fibrose pulmonar, que podem ser responsáveis pelas altas taxas de morbimortalidade associadas à pneumonia viral aguda não pandêmica na infância. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da IL-17 em uma população pediátrica que morreu com pneumonia viral aguda não-pandêmica em comparação com o grupo de pneumonia não-viral. Amostras de pulmão de necropsia (n = 193) de crianças que morreram após pneumonia por infecção aguda grave foram selecionadas e processadas para detecção de antígeno viral por imunohistoquímica. Depois disso, foi separado em dois grupos: amostras positivas para vírus (n = 68) e negativas para vírus (n = 125). A imuno-histoquímica foi realizada para avaliar a

presença de IL-17 no tecido pulmonar. O grupo positivo para vírus mostrou uma marcação imunológica mais forte para a IL-17 ($p = 0,020$). O resultado deste estudo pode sugerir que a IL-17 desempenha um papel importante na manutenção da infecção viral e das lesões pulmonares, pois essa citocina pode eventualmente induzir a produção de agentes antiapoptóticos e produzir quimiotaxia de neutrófilos. Esses aspectos ajudam a aumentar a gravidade do processo infeccioso, levando a uma maior morbidade e mortalidade nesses pacientes.

Palavras-chave: vírus; pneumonia; mortalidade; IL-17.

1. Introdução

As infecções respiratórias agudas são responsáveis por uma alta taxa de atendimento médico e hospitalização no mundo. A etiologia viral em si, representa importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente entre crianças menores de cinco anos de idade [1].

Pneumonia é um termo genérico usado para descrever a inflamação aguda do trato respiratório inferior e é uma causa primária de hospitalização e morte em crianças menores de cinco anos em todo o mundo [2-9]. Vírus e bactérias são os agentes etiológicos mais comuns [4-6] e um aumento na incidência de pneumonia viral na última década foi observado, talvez devido ao surgimento de novas cepas de vírus e à melhora das técnicas de diagnóstico, permitindo um diagnóstico virológico mais preciso.

Muitos tipos de vírus estão envolvidos com a hospitalização devido a infecções virais, mas o agente mais frequentemente identificado em infecções do trato respiratório inferior é o Vírus Sincicial Respiratório (VSR), que tem distribuição mundial e circula principalmente nos meses de inverno [10-13].

Outro vírus envolvido com infecção respiratória é o adenovírus, que é causa frequente de infecções auto-limitantes do trato respiratório superior [14]. Infecções adenovirais do trato respiratório inferior são infrequentes, esporádicas e mais comumente associadas aos tipos de adenovírus 3, 5 e 7 [15-19].

As epidemias e pandemias de influenza representam um sério problema de saúde em todo o mundo, e o fato de que certos segmentos da população serem mais suscetíveis a infecções graves resulta em aumento da morbidade e mortalidade aumentando como consequência a complexidade da doença [20-24].

A interleucina-17, também conhecida como IL-17A, é a citocina característica de um novo subconjunto T-helper denominado Th17 [25-28]. Macrófagos e neutrófilos são também as principais fontes de IL-17 [29-30], e o receptor de IL-17 (IL-17RA) é expresso em níveis particularmente altos em tecidos hematopoiéticos [25,31]. Esta interleucina tem papel importante na ligação da imunidade inata e adaptativa; está envolvida na defesa do hospedeiro contra patógenos extracelulares [32-38] e, juntamente com a IL-6, também desempenha papel na promoção da persistência viral pela inibição da apoptose celular e da função das células T citotóxicas [39-41]. A IL-17 também tem um papel de induzir a produção de quimiocinas que recrutam neutrófilos para o foco infeccioso.

Com base neste possível envolvimento da IL-17 no processo inflamatório e anti-apoptótico, testamos a hipótese de que a expressão tecidual dessa proteína pode desempenhar o papel de induzir lesões pulmonares em pneumonias virais agudas letais não pandêmicas na população pediátrica.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a expressão tecidual da IL-17 em amostras de pulmão de necropsia, obtidas de crianças com pneumonia viral aguda não-pandêmica letal, e comparando com grupo de pneumonia aguda não-viral e não-letal.

2. Materiais e métodos

População de estudo

De 794 casos pediátricos envolvendo necropsia (ocorrendo entre 1960 e 2004) e cuja causa de morte foi pneumonia aguda letal e não pandêmica, foram selecionadas 193 amostras de tecido pulmonar parafinado, fixadas em formalina (FFPE). As amostras foram então classificadas em dois grupos considerando a presença viral: positiva para vírus (n = 68) e negativa para vírus (n = 125) [42-45]. O comitê de ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná revisou e aprovou o estudo (número de registro 1099.138 / 2005; 30 de agosto de 2005).

Na seqüência, as amostras foram categorizadas segundo sexo, idade, sazonalidade, padrão patológico e sobrevida. Em relação à idade, os pacientes foram divididos em menores de 1 ano e maiores de 1 ano. Para contabilizar a sazonalidade, classificamos as amostras de acordo com a ocorrência da morte das crianças, se durante os meses frios ou quentes. Os padrões anatomopatológicos foram divididos em broncopneumonia ou pneumonite intersticial. A sobrevida foi definida como o período de tempo entre a data do internamento e a data da morte.

Todos os casos já haviam sido testados quanto à presença de vírus sincicial respiratório (VSR), anti-adenovírus (AdV), anti-parainfluenza 1, 2 e 3 (PIV1, PIV2 e PIV3) e anti-influenza A e B (A FLU e B FLU) usando imuno-histoquímica, e eles foram divididos em 2 grupos: positivos para o vírus e negativos para o vírus [42-45].

Reações imuno-histoquímicas

Os blocos de parafina de tissue microarray (TMA) utilizados para realizar as reações imuno-histoquímicas continham duas amostras de pulmão por caso com 3mm de diâmetro cada.

Para observar a expressão de interleucina-17 nos septos alveolares utilizando imuno-histoquímica, utilizou-se os anticorpos primários anti-IL-17 (coelho policlonal; ambos 1: 600; ambos da Bioss TM). Todos os ensaios de imuno-histoquímica incluíram tanto um controle negativo (com supressão de anticorpo primário) como um controle positivo.

Um ensaio de imunoperoxidase modificado foi parte da imuno-histoquímica, conforme relatado por Chong e colegas (2009). A recuperação antigênica foi realizada usando um BioSB TM ImmunoRetriever. Amostras de tecidos foram incubadas com os anticorpos primários (IL-17) em câmara úmida em temperatura ambiente por uma hora. As incubações com o anticorpo secundário (Sistema Dako Advance TM HRP, DakoCytomation, Inc., CA, EUA) foram realizadas durante 30 minutos. Incubações com substrato de 3,3'-diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (DakoCytomation, Inc., CA, EUA) foram realizadas por 3 minutos para visualizar coloração positiva.

As lâminas de TMA foram examinadas por um observador que não tinha conhecimento prévio dos resultados dos testes virais usando um microscópio óptico BX50 Olympus (Japão) com uma ampliação de 40 vezes. Para cada caso, 8 campos de grande aumento foram selecionados aleatoriamente, e a área de imunomarcção no septo alveolar foi quantificada usando o programa de análise de imagem Image-Pro PlusTM. A imunexpressão tecidual média da IL-17 por micrômetro quadrado (μm^2) foi determinada em cada HPF.

Análise estatística

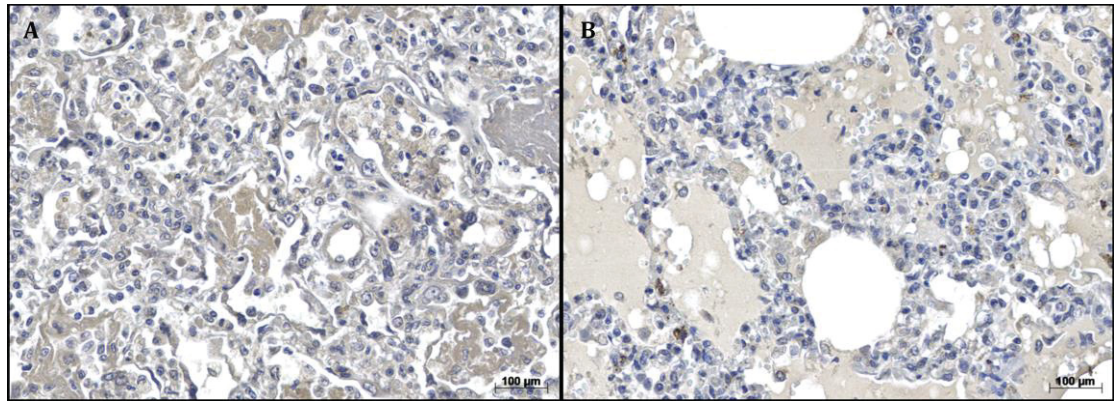
A análise estatística foi realizada no programa SPSS (versão 20.0). Os resultados foram expressos como média, mediana e desvio padrão, frequências ou porcentagens. Para comparar as variáveis quantitativas entre os grupos, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparar as variáveis categóricas entre os grupos, foi realizado o teste exato de Fisher ou o teste qui-quadrado. A análise de sobrevida univariada foi feita com o método de Kaplan-Meier e o teste de Log-rank. A análise multivariada foi realizada incluindo variáveis com $p < 0,20$ na análise univariada ou com significado clínico. Significância estatística foi aceita para valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

A população do estudo foi de 193 necropsias pediátricas (107 homens e 86 mulheres) divididas em grupos positivos para vírus ($n = 68$; 35,2%) e negativos para vírus ($n = 125$; 76,5%),

diferença observada na figura 1. Características clínicas como idade, sexo ou sazonalidade, padrões anatomopatológicos, sobrevida e expressão tecidual da IL-17 estão listados na tabela 1.

Figura 1: Reação de imunohistoquímica para amostras vírus-positivo x vírus-negativo



A- Reação imunohistoquímica para com anticorpo anti- IL-17 em amostra do grupo positivo para vírus. B- Reação imunohistoquímica para com anticorpo anti- IL-17 em amostra do grupo negativo para vírus. Imagem obtida utilizando o scanner de lâminas da Zeiss AxioScan em objetiva com aumento de 20x.

Tabela 1. Características basais da população em relação à classificação em dois grupos considerando a presença viral.

Características Básicas da População	Vírus-positivo n = 68	Vírus-negativo n = 125	Valor de p
Idade §	(1.7±2.8)	(1.8±3.1)	0.8
Gênero			14*
Masculino	35 (51.5)	72 (57.6)	
Feminino	33 (48.5)	53 (42.4)	0.4
Sazonalidade			50**
Meses Quentes	24 (35.3)	47 (37.6)	
Meses Frios	44 (64.7)	78 (63.4)	0.7
Hemocultura			51**
Positivo	40 (58.8)	26 (52.0)	
Negativo	28	24 (48.0)	0.5
			74**

		(41.2)		
	Broncopneumonia	50	101 (80.8)	
<i>Padrões Patológicos</i>		(73.5)		0.2
	Pneumonite	18	24 (9.2)	42**
	Intersticial	(26.5)		
<i>Tempo de Sobrevida (dias) §</i>		12.9±6.		0.3
		8	13.9±6.9	40***
<i>Expressão de IL-17 †§</i>		3999±3		0.0
		444	2870±2204	20**

Teste de T-Student; ** Quiquadrado de Fisher; *** teste de Wilcoxon; § Média + Desvio Padrão; † expressão tecidual de IL-17 de acordo com a curva mediana (micrômetros quadrados) por campo de alta potência. IG, idade gestacional.

Em relação à sazonalidade, 63,2% (122) da amostra estavam concentrados nos meses mais frios e 36,8% nos meses considerados quentes.

As manifestações clínicas de todos os pacientes (n = 193) apresentados ao diagnóstico foram: febre (n = 4, 3,3%); tosse (n = 28, 23,0%); febre e tosse (n = 29, 23,8%) e 61 (50,0%) indivíduos apresentaram infecção respiratória aguda. As manifestações clínicas foram comparadas à expressão tecidual de IL-17 sem resultados significativos (dados não mostrados).

Hemoculturas para bactérias no grupo soropositivo tiveram 40 (58,82%) e 28 (41,18%) resultados positivos e negativos, respectivamente. Por outro lado, no grupo com vírus negativo, 73 (58,4%) pacientes não têm hemocultura para bactérias relatadas nos registros. No grupo com vírus negativo que fez hemocultura (n = 52), 27 (51,92%) tiveram resultados positivos. As bactérias identificadas foram: *Escherichia coli*, *Escherichia coli* - Beta-Lactamases de Espectro Estendido (E. ESBL), *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* - Beta-Lactamases de Espectro Estendido (K. ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*. Entre as linhagens bacterianas, K. ESBL e *Staphylococcus aureus* apresentaram a maior prevalência, com 8,9 e 5,3%, respectivamente. A hemocultura para bactéria foi comparada à expressão tecidual de IL-17 sem resultados significativos (dados não mostrados).

A expressão tecidual da IL-17 foi determinada de acordo com a área média (micrômetros quadrados) por campo de grande aumento. Quando a expressão de IL-17 foi avaliada pela mediana, os casos positivos para o vírus mostraram forte expressão tecidual de IL-17 em comparação com casos negativos para o vírus (p = 0,020).

Na tabela 2 é mostrado o vírus encontrado na população estudada e a relação da expressão da IL-17. O parainfluenza 2 (p = 0,050) e o influenza A (p = 0,025) mostraram expressão tecidual mais

significativa de IL-17 quando comparados ao grupo negativo para vírus. A co-infecção viral foi observada em 41 (57,7%) casos.

Tabela 2. Tipos de vírus encontrados na população estudada em relação à expressão tecidual da IL-17.

Tipo viral	Virus-positivo		Virus-negativo		valor de p^*
	n	Media±DP †	n	Media±DP †	
<i>RSV</i>	41	3715±3318	114	2870±2203	0,136
<i>AdV</i>	23	3260±3087	114	2870±2203	0,569
<i>PIV 1</i>	11	3278±3284	114	2870±2203	0,694
<i>PIV 2</i>	16	5068±4066	114	2870±2203	0,050
<i>PIV 3</i>	25	3702±3255	114	2870±2203	0,233
<i>FLU A</i>	17	5167±3777	114	2870±2203	0,025
<i>FLU B</i>	13	4325±3216	114	2870±2203	0,136

*Qui-quadrado de Pearson; † Expressão tecidual de IL-17 de acordo com a curva mediana (micrômetros quadrados) por campo de alta potência. SD, desvio padrão; VSR, *vus sincicial respiratio*; Adv, *adenovirus*; PIV, *parainfluenza*; GRIPE, *gripe*.

A Tabela 3 mostra a associação da expressão tecidual da IL-17 e características basais dos pacientes. Nenhum resultado significativo foi encontrado.

Tabela 3. Características basais da população em relação ao padrão de IL-17.

Características Basais	IL-17 (fraco) †	IL-17 (forte) †	valor de p^*
<i>Idade</i>	≤ 1 ano	53 (60.2)	0.713
	> 1 anor	35 (39.8)	
<i>Gênero</i>	Masculino	46 (52.3)	0.329
	Feminino	42 (47.7)	

<i>Sazonalidade</i>	Meses Quentes	33 (37.5)	32 (36.0)	0.831
	Meses Frios	55 (62.5)	57 (64.0)	
<i>Padrão Histopatológico</i>	Broncopneumonia	65 (73.9)	75 (84.3)	0.089
	Pneumonite	23 (26.1)	14 (15.7)	
	Instersticial			
<i>Sobrevida (dias) §</i>		13.5±6.8	13.0±7.1	0.563

*Qui-quadrado de Pearson; §Mean + Desvio Padrão; † Classificação fraca e forte com base na expressão tecidual de IL-17 de acordo com a curva mediana (micrômetros quadrados) por campo de alta potência.

Acessamos a contagem de células CD4 +, CD8 +, CD14 +, CD25 + e neutrófilos de outro estudo com a mesma população [44]. Não há correlação entre a expressão tecidual de IL-17 e infiltrações celulares nas amostras de tecido.

4. Discussão

Muitas citocinas estão envolvidas no aumento da persistência viral e na elevação da resposta das células Th17 nas lesões pulmonares. Neste estudo retrospectivo, descrevemos a associação da expressão tecidual pulmonar de IL-17 em crianças com pneumonia viral aguda não-pandêmica letal.

O padrão histológico predominante, mesmo em amostras com positividade viral, foi broncopneumonia, embora sem significância estatística. Este padrão morfológico é característico de infecções pulmonares bacterianas. No entanto, também foi descrito para pneumonia por vírus. Além disso, acredita-se que os vírus respiratórios favorecem a entrada e disseminação de bactérias sistêmica e localmente [46,47]. Em um estudo prospectivo, a incidência de co-infecções bacterianas mostrou um curso clínico mais grave [48,49].

Nossos resultados mostram 67 pacientes pediátricos com hemocultura positiva para bactérias (55,8%), sendo Kleibseria ESBL e Staphylococcus aureus os mais prevalentes. Estes tipos bacterianos são comumente encontrados em processos infecciosos e podem ser o resultado de infecção secundária após infecção viral.

A IL-17 é produzida principalmente por células T CD4 +, mas células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais também produzem essa citocina [50,51]. Nos casos positivos para o vírus, a expressão tecidual mais alta da IL-17 foi estatisticamente significativa ($p = 0,020$) quando comparada aos casos negativos para o vírus. Além disso, não houve correlação entre a infiltração celular nas amostras de tecido e a expressão tecidual de IL-17.

Os papéis das citocinas efetoras Th17 na defesa do hospedeiro foram extensivamente revisados. Ye e colaboradores (2001) demonstraram que camundongos IL-17RA^{-/-} são altamente suscetíveis à infecção pulmonar por *K. pneumoniae* [52]. A IL-17 pode promover a persistência viral pela inibição da apoptose celular e da função das células T citotóxicas, e ter uma regulação positiva sinérgica, com IL-6, da expressão de Bcl-2 e Bcl-xL [39]. Assim, a IL-17 apresentou-se como uma interleucina, desempenhando papéis na resposta inflamatória, bem como resistência à atividade de apoptose contra células infectadas por vírus.

Uma característica interessante foi a associação com alguns dos tipos virais. O parainfluenza 2 (PIV2) mostrou significância limítrofe ($p = 0,050$) demonstrando maior expressão de tecido de IL-17 quando comparado ao grupo negativo de vírus. Existem vários tipos de vírus influenza e eles têm como alvo as células epiteliais das vias aéreas [53]. Anticorpos, produzidos por esses vírus, são protetores contra reinfecções com o mesmo sorotipo; no entanto, eles não fornecem imunidade heterossensível a vírus sorologicamente distintos [53,54]. Portanto, a modulação da imunidade Th17 pelos vírus influenza aumenta a patologia pulmonar e a suscetibilidade à pneumonia bacteriana secundária. As infecções por vírus parainfluenza geram um aumento anormal na produção de certas citocinas pelas células infectadas, embora as culturas de fibroblastos de células pulmonares infectadas com o vírus não tenham mostrado nenhuma mudança significativa na produção de IL-17 [55].

O vírus influenza tipo A (FLUA) apresentou maior expressão tecidual de IL-17 quando comparado ao grupo negativo ($p = 0,025$; tabela 2). As epidemias sazonais de influenza causadas pelos vírus influenza A e B ocorrem anualmente durante o inverno nas regiões temperadas, resultando em cerca de 3 a 5 milhões de casos de doenças graves e 250.000 a 500.000 mortes em todo o mundo a cada ano [56]. As infecções do trato respiratório provocam uma resposta imune robusta, que é necessária para uma depuração eficiente do vírus, mas ao mesmo tempo pode contribuir para o dano pulmonar e aumentar a morbidade [57-59]. Além de funções importantes na depuração de vírus, as células T CD8⁺ também podem servir como um importante contribuinte para o desenvolvimento de inflamação excessiva e lesão pulmonar aguda após a infecção pelo vírus [59]. A neutrofilia em infecções por influenza A tem sido relatada, e o recrutamento excessivo de neutrófilos nas vias aéreas, causado pela IL-17, leva a um dano tecidual bastante significativo do ponto de vista clínico. Esses danos podem levar à morte [44,60].

Indivíduos com baixa idade compuseram nossa amostra e isso pode ser um fator de confusão. Esse aspecto poderia introduzir um viés, já que indivíduos com pouca idade acabam produzindo menos defesas, por exemplo. Outra limitação é que o tamanho da amostra pode ser considerado pequeno. No entanto, esse número é a realidade clínica incorporada em um espaço de tempo.

Algumas perspectivas futuras no manejo de pacientes pediátricos poderiam ser sugeridas, como a inclusão de identificação dos tipos virais precocemente. Um aspecto importante é o uso sempre presente da tecnologia de biologia molecular. Entre eles, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é freqüentemente usada para rastrear a infecção pelo vírus. Como o manejo adequado desses pacientes depende do diagnóstico precoce e da diferenciação de outras condições, a PCR pode ser uma ferramenta valiosa [61,62]. Mais recentemente, o desenvolvimento de ensaios de PCR em tempo real permitiu a quantificação do vírus. A determinação e o monitoramento sanguíneo do vírus podem ser importantes para o tratamento e o prognóstico dessas infecções, e estão se tornando amplamente aceitos, especialmente para a população pediátrica. Além disso, a incorporação de novos agentes que visam bloquear as ações da IL-17 é uma maneira promissora de tratar doenças como a artrite reumatóide. Genovese e colaboradores (2010) mostraram que o anticorpo monoclonal anti-IL-17 humanizado por LY2439821, quando adicionado com drogas anti-reumatóides que modificam a doença oral, melhora os sinais e sintomas da artrite reumatóide [63]. Assim, temos novas ferramentas que ajudam a melhorar o manejo desse grupo de pacientes suscetíveis.

Nossos resultados mostram que a presença de diferentes tipos de vírus pode estar indiretamente estimulando níveis mais altos de expressão de IL-17. Este aumento da expressão tecidual da IL-17 estava causando atração excessiva de neutrófilos, o que pode estar contribuindo para o aumento do dano ao tecido pulmonar. No entanto, a maior presença de IL-17 também estava impedindo os mecanismos de defesa apoptótica da célula pulmonar infectada. Assim, o processo de infecção viral permaneceria por mais tempo e, por esse motivo, a infecção poderia atingir as porções pulmonares inferiores. Portanto, a IL-17 contribui para o aparecimento e progressão do dano tecidual pulmonar, trazendo consigo altas taxas de mortalidade.

***Contribuições dos Autores:** MLVA realizou a imunohistoquímica, foi responsável pela análise e interpretação dos dados e redigiu o manuscrito. MASM analisou os dados e contribuiu para a redação do manuscrito e CBVP é um aluno de doutorado do nosso grupo e apoio em todos os experimentos e redação do artigo. CMS auxiliado com dados de análise estatística, contribuiu para a redação do manuscrito e as tabelas de resultados. A SMR foi responsável pela coleta e preparação de amostras de pacientes e PCR para confirmar a presença do vírus. O VHCJ forneceu os registros médicos com os dados necessários para análise. RH, GR e PCG são estudantes de graduação e forneceram suporte operacional. O LN supervisionou o projeto e foi um dos principais contribuintes na redação do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.*

***Financiamento:** Por favor, adicione: Esta pesquisa foi financiada pelo nível de pesquisa de produtividade 2 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).*

***Agradecimentos:** Os autores expressam sua gratidão ao Sr. Seigo Nagashima por seu auxílio na obtenção e preparação da morfometria, e Dra. Márcia Olandoski pela realização da análise estatística.*

***Aprovação em comitê de ética e consentimento:** O comitê de ética do HC-UFPR revisou e aprovou o estudo. Número de registro 1099.138 / 2005; 30 de agosto de 2005.*

***Conflitos de Interesse:** Os autores declaram não haver conflitos de interesse.*

5. Referências

1. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. 2011. Viral Pneumonia. *Lancet* 377: 1264-75. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61459-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61459-6).
2. Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. 2008. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ* 86: 408-16.
3. McIntosh K. 2002. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med* 346: 429-37. <https://doi.org/10.1056/NEJMra011994>.
4. Cruz AT, Cazacu AC, McBride LJ, Greer JM, Demmler GJ. 2006. Performance characteristics of a rapid immunochromatographic assay for detection of influenza virus in children during the 2003 to 2004 influenza season. *Ann Emerg Med* 47: 250-54. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2005.10.019>.
5. Quan PL, Palacios G, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Pozo F, Jack PJ, Cisterna D, Renwick N, Hui J, Drysdale A, Amos-Ritchie R, Baumeister E, Savy V, Lager KM, Richt JA, Boyle DB, García-Sastre A, Casas I, Perez-Breña P, Briese T, Lipkin WI. 2007. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* 45: 2359-64. <https://doi.org/10.1128/JCM.00737-07>.
6. Lambert SB, Allen KM, Carter RC, Nolan TM. 2008. The cost of community-managed viral respiratory illnesses in a cohort of healthy preschool-aged children. *Respir Res* 9: 11. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-11>.
7. Rudan I, O'Brien KL, Nair H, Liu, Theodoratou E, Qazi S, Lukšić I, Fischer Walker CL, Black RE, Campbell H; Child Health Epidemiology Reference Group (CHERG). 2013. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *J Global Health* 3: 010401. <https://doi.org/10.7189/jogh.03.010401>.
8. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, Mathers C, Black RE. 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379: 2151-61. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60560-1).
9. Østergaard MS, Kjærgaard J, Kristensen MM, Reventlow S, Poulsen A, Isaeva E, Akylbekov A, Sooronbaev T. 2018. Recurrent lower respiratory illness among young children in rural Kyrgyzstan: overuse of antibiotics and possible under-diagnosis of asthma. A qualitative FRESH AIR study. *NPJ Prim Care Respir Med* 28:13. <https://doi.org/10.1038/s41533-018-0081-y>.
10. Shann F. 1986. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Pediatr Infect Dis* 5: 247-52.
11. Kneyber MCJ, Moll HA, Groot R. 2000. Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur J Pediatr* 159: 399-411.
12. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi. 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 360: 588-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804877>.
13. Giordano S, Di Gangi M, Failla MC, Bruno L, Falcone V, Dones P. 2018. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and hypertransaminasemia. *Infez Med* 26: 81-4.
14. Malekshahi S, Shafiei-Jandaghi N, Yavarian J, Shadab A, Naseri M, Azad T. 2017. Detection of respiratory co-infections in children less than five years with adenovirus infection. *Arch Pediatr Infect Dis* 5: e36953. <https://doi.org/10.5812/pedinfect.36953>.
15. Murtagh P, Cerqueiro C, Halac A, Avila M, Kajon A. 1993. Adenovirus type 7h respiratory infections. A report of 29 cases of acute lower respiratory disease. *Acta Paediatrica* 82: 557-61.
16. Esposito S, Zampiero A, Bianchini S, Mori A, Scala A, Tagliabue C, Sciarrabba C, Fossali E, Piralla A, Principi N. 2016. Epidemiology and clinical characteristics of respiratory infections due to adenovirus in children living in Milan, Italy, during 2013 and 2014. *PlosOne* 11: e0152375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152375>.
17. Crabtree PA, Gerba KD, Rose CP, Haas, CN. 1997. Waterborne adenovirus: a risk assessment. *Water Science and Technology* 35:1-6. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00225-4](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00225-4).

18. Madhi SA, Schoub B, Simmark K, Blackburn N, Klugman K P. 2000. Increased burden of respiratory viral associated severe lower respiratory tract infections in children infected with human immunodeficiency virus type-1. *The Journal of Pediatrics* 137: 78–84. <https://doi.org/10.1067/mpd.2000.105350>.
19. Khanal S, Ghimire P and Dhamoon A. 2018. The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines* 6: 30-42. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010030>.
20. Elf S, Auvinen P, Jahn L, Liikonen K, Sjöblom S, Saavalainen P, Mäki M, Eboigbodin KE. 2018. Development and evaluation of a rapid nucleic acid amplification method to detect influenza A and B viruses in human respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis pii: S0732-8893: 30119-6*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.006>.
21. Palese PSM. 2007. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM HP, ed. *Fields Virology*. Vol 1. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 1647-90.
22. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459: 931-39. <https://doi.org/10.1038/nature08157.m>
23. Taubenberger JK, Kash JC. 2010. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 7: 440-51. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>.
24. Kumar B, Asha K, Khanna M, Ronsard L, Meseko CA, Sanicas M. 2018. The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control. *Arch Virol* 163: 831-44. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3708-y>.
25. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JL, Spriggs MK. 1995. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3: 811-21.
26. Yu JJ, Gaffen SL. 2008. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 13: 170-77.
27. Gaffen SL. 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9: 556-67. <https://doi.org/10.1038/nri2586>.
28. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361: 888-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0707449>.
29. O'Brien RL, Roark CL, Born WK. 2009. IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur J Immunol* 39: 662-66. <https://doi.org/10.1002/eji.200839120>.
30. Schulz SM, Kohler G, Holscher C, Iwakura Y, Alber G. 2008. IL-17A is produced by Th17, gammadelta T cells and other CD4- lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol* 20: 1129-38. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn069>.
31. Awasthi A, Kuchroo VK. 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 21: 489-98. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp021>.
32. Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. 1998. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 161: 409-14.
33. Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS. 2006. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 54: 1122-31. <https://doi.org/10.1002/art.21749>.
34. Ciprandi G, De Amici M, Murdaca G, Fenoglio D, Ricciardolo F, Marseglia G, Tosca M. 2009. Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy* 64:1375-78. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02010.x>.
35. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70.
36. Zrioual S, Ecochard R, Tournadre A, Lenief V, Cazalis MA, Miossec P. 2009. Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol* 182: 3112–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801967>.
37. Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY. 2002. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 197: 322-32. <https://doi.org/10.1002/path.1117>.
38. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. 2017. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. *Mediators Inflamm* 2017: 3908061. <https://doi.org/10.1155/2017/3908061>.

39. Hou W, Jin YH, Kang HS, Kim BS. 2014. IL-6 and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function. *J Virol pii: JVI.00724-14*. <https://doi.org/10.1128/JVI.00724-14>.
40. Garraud K, Cleret A, Mathieu J, Fiole D, Gauthier Y, Quesnel-Hellmann A, Tournier JN. 2012. Differential role of the interleukin-17 axis and neutrophils in resolution of inhalational anthrax. *Infect Immun* 80: 131-42. <https://doi.org/10.1128/IAI.05988-11>.
41. Sônego F, Castanheira FV, Ferreira RG, Kanashiro A, Leite CA, Nascimento DC, Colón DF, Borges Vde F, Alves-Filho JC, Cunha FQ. 2016. Paradoxical Roles of the neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. *Front Immunol* 7: 155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00155>.
42. Chong DC, Raboni SM, Abujamra KB, Marani DM, Nogueira MB, Tsuchiya LR, Neto HJ, Flizikowski FB, de Noronha L. 2009. Respiratory viruses in pediatric necropsies: an immunohistochemical study. *Pediatr Dev Pathol* 12: 211-6. <https://doi.org/10.2350/07-02-0229.1>.
43. do Carmo Debur M, Raboni SM, Flizikowski FB, Chong DC, Persicote AP, Nogueira MB, Rosele LV, de Almeida SM, de Noronha L. 2010. Immunohistochemical assessment of respiratory viruses in necropsy samples from lethal non-pandemic seasonal respiratory infections. *J Clin Pathol* 63: 930-4. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.077867>.
44. de Souza Costa VH Jr, Baurakiades E, Viola Azevedo ML, Traiano G, Kowal Rosales J, Kunze Larsen KS, Raboni SM, de Noronha L. 2014. Immunohistochemistry analysis of pulmonary infiltrates in necropsy samples of children with non-pandemic lethal respiratory infections (RSV; ADV; PIV1; PIV2; PIV3; FLU A; FLU B). *J Clin Virol* 61: 211-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.026>.
45. Baurakiades E, Costa VH Jr, Raboni SM, de Almeida VR, Larsen KS, Kohler JN, Gozzo Pdo C, Klassen G, Manica GC, de Noronha L. 2014. The roles of ADAM33, ADAM28, IL-13 and IL-4 in the development of lung injuries in children with lethal non-pandemic acute infectious pneumonia. *J Clin Virol* 61: 585-9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.10.004>.
46. Takala AK, Meurman O, Kleemola M, Kela E, Rönberg PR, Eskola J, Mäkelä PH. 1993. Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive Haemophilus influenzae type b disease. *Pediatr Infect Dis J* 12:189-95.
47. Herfst S, Böhringer M, Karo B, Lawrence P, Lewis NS, Mina MJ, Russell CJ, Steel J, de Swart RL, Menge C. 2017. Drivers of airborne human-to-human pathogen transmission. *Curr Opin Virol* 22: 22-9. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.11.006>.
48. Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, van Saene HK. 2006. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax* 61: 611-5. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.048397>.
49. McCullers J. 2014. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol* 12: 252-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3231>.
50. Kennedy J, Rossi DL, Zurawski SM, Vega F Jr, Kastelein RA, Wagner JL, Hannum CH, Zlotnik A. 1996. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR+CD4-CD8-T Cells. *J Interferon Cytokine Res* 16: 611-7. <https://doi.org/10.1089/jir.1996.16.611>.
51. Cai T, Qiu J, Ji Y, Li W, Ding Z, Suo C, Chang J, Wang J, He R, Qian Y, Guo X, Zhou L, Sheng H, Shen L, Qiu J. 2018. IL-17-producing ST21 group 2 innate lymphoid cells play a pathogenic role in lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol* S0091-6749: 30453-6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.03.007>.
52. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194: 519-27.
53. Woodland DL, Hogan RJ, Zhong W. 2001. Cellular immunity and memory to respiratory virus infections. *Immunol Res* 24: 53-67. <https://doi.org/10.1385/IR:24:1:53>.
54. Aljurayyan A, Puksuriwong S, Ahmed M, Sharma R, Krishnan M, Sood S, Davies K, Rajashekar D, Leong S, McNamara PS, Gordon S, Zhang Q. 2018. Activation and Induction of Antigen-Specific T Follicular Helper Cells Play a Critical Role in Live-Attenuated Influenza Vaccine-Induced Human Mucosal Anti-influenza Antibody Response. *J Virol* 92: e00114-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00114-18>.
55. Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. 2010. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways (I κ B kinase and p38 MAPK) in

- parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front Microbiol* 1: 124. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00124>.
56. World Health Organization website. Influenza fact sheet. Available: <http://www.who.int/en/news-room/detail/14-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year>. Accessed 2018 Mai 29.
 57. Graham MB, Braciale TJ. 1997. Resistance to and Recovery from Lethal Influenza Virus Infection in B Lymphocyte-deficient Mice. *The Journal of Experimental Medicine* 186: 2063–8.
 58. Eichelberger M, Allan W, Zijlstra M, Jaenisch R, Doherty PC. 1991. Clearance of influenza virus respiratory infection in mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted CD8+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 174: 875–80.
 59. Schmidt M & Varga S. 2018. The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections. *Front Immunol* 9: 678. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00678>.
 60. Sichelstiel A, Yadava K, Trompette A, Salami O, Iwakura Y, Nicod LP, Marsland BJ. 2014. Targeting IL-1b and IL-17A Driven Inflammation during Influenza-Induced Exacerbations of Chronic Lung Inflammation. *PLoS One* 9: e98440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098440>.
 61. Lankester, A. C., M. van Tol, E. Claas, J. Vossen, and A. Kroes. 2002. Quantification of adenovirus DNA in plasma for management of infection in stem cell graft recipients. *Clin Infect Dis* 34: 864–867. <https://doi.org/10.1086/339073>.
 62. Resa C, Magro S, Marechal P, Barranger C, Joannes M, Mischczak F, Vabret A. 2014. Development of an efficient qRT-PCR assay for quality control and cellular quantification of respiratory samples. *J Clin Virol* 60: 270-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.03.019>.
 63. Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P, Sloan-Lancaster J. 2010. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody in the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62: 929–39. <https://doi.org/10.1002/art.27334>

4.2 Artigo 2

Expressão Tecidual Pulmonar da IL-17 na Pneumonia Viral Aguda Pandêmica Causada pelo Vírus H1N1

Marina Luise Viola Azevedo, BS, MSc^{1,2*}; Mineia Alessandra Scaranello Malaquias, MsC, PhD¹; Caroline Busatta Vaz de Paula, BS, MSc¹; Cleber Machado de Souza, PhD⁴; Victor Horácio Costa Júnior, MD, MSc, PhD¹; Sonia Maria Raboni MD, MSc, PhD³; Kauana Oliveira Gouveia¹; Thais Teles Soares Kondo¹; Ana Luisa Garcia Giamberardino¹; Gabrielle Tasso Gonçalves¹; Larissa Cristina Biscaro¹; Lucia de Noronha, MD, MSc, PhD¹

¹ Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

² Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Universidade Federal do Paraná

³ Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

⁴ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Pelé Pequeno Príncipe* Correspondência: Lúcia de Noronha. Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho Curitiba - Paraná, Brasil.

E-mail: lnno.noronha@gmail.com

Resumo

Introdução: As infecções agudas das vias aéreas representam uma importante causa de morbimortalidade em todo o mundo na infância. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que, na última década, cerca de um terço da mortalidade mundial em crianças foi devida a infecção respiratória aguda severa das vias aéreas inferiores. Em abril de 2009, um novo vírus Influenza A H1N1 foi identificado e, em pouco tempo, tornou-se a doença pandêmica do século. O vírus pandêmico (pH1N1) é diferenciado do vírus da gripe sazonal (H1N1) pela maneira como induz uma resposta pró-inflamatória em humanos e modelos animais. As diferenças e a continuidade da circulação mundial do vírus evidenciaram a necessidade de aprofundar os estudos sobre esse vírus. Assim, a busca por biomarcadores sanguíneos ou teciduais é essencial para a prevenção dessa doença e sua morbidade e mortalidade.

Objetivo: Avaliar a expressão de interleucinas teciduais 8 e 17 (IL-8 e IL-17) e o número de neutrófilos em amostras pulmonares de pacientes que morreram por pneumopatia grave causada pelo vírus pandêmico H1N1, correlacionando com a expressão em amostras de - Casos de pandemia.

Métodos: Dez amostras pulmonares de adultos que morreram de uma infecção respiratória aguda grave causada pelo vírus pandêmico H1N1 (grupo H1N1 pandêmico). Além disso, 67 amostras pulmonares de crianças que morreram de uma infecção respiratória aguda grave causada pelo vírus não-pandêmico (grupo não-pandêmico). Amostras pulmonares adicionais de adultos (grupo controle basal adulto = 11) e crianças (grupo controle basal pediátrico = 19) que morreram de uma variedade de causas, excluindo qualquer doença pulmonar, também foram incluídas. Todas as amostras foram fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE) e as seções de lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E). As lâminas em H & E foram usadas para a classificação histopatológica do dano pulmonar, o número de neutrófilos avaliados e a seleção de áreas para produzir o microarray tecidual (TMA). A identificação de IL-8 e IL-17 nas amostras foi realizada pela técnica de imunohistoquímica (IHQ). O software Image Pro plus TM analisou a expressão tecidual das interleucinas e avaliou o número de neutrófilos.

Resultados: Um aumento da expressão tecidual de IL-17 e IL-8, e um número maior de neutrófilos foram identificados nas amostras do grupo H1N1 pandêmico quando comparado ao grupo não-pandêmico.

Conclusões: Sugere-se que o vírus H1N1, circulante e responsável pelo episódio pandêmico de 2009, apresenta alta virulência e, portanto, provoca uma resposta exacerbada do sistema imunológico do hospedeiro. Essa resposta é caracterizada, principalmente, pela presença de neutrófilos que aumentam o dano pulmonar, o que resulta no agravamento do estado dos pacientes e, conseqüentemente, na diminuição do tempo de sobrevivência.

Palavras-chave: vírus, IL-8, IL-17, H1N1, imuno-histoquímica.

1. Introdução

As infecções agudas das vias aéreas constituem uma causa importante de morbidade e mortalidade na infância, particularmente nos países em desenvolvimento^{1,2}. É a principal causa de morte em crianças menores de 5 anos fora do período neonatal³. A pneumonia matou 920.136 crianças menores de 5 anos em 2015, respondendo por 15% das mortes nessa faixa etária⁴. É também a segunda causa de anos de vida perdidos devido à mortalidade prematura e uma das causas mais frequentes de hospitalização^{5,6}. No Brasil, a pneumonia aguda grave é responsável por 11% das mortes em crianças menores de um ano e 13% na faixa etária de um a quatro anos, sendo as etiologias virais e bacterianas

as mais comuns^{1,7}.

Surtos atuais do vírus Influenza são esperados a cada 8-41 anos, semelhantes aos do subtipo do vírus Influenza A H1N1, ocorrido em 2009⁸. Segundo os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a pandemia causou 61 milhões de casos sintomáticos, 274.000 internações e 12.500 óbitos apenas nos Estados Unidos de abril de 2009 a abril de 2010⁹. A pneumonia severa é apontada como uma das causas de morte relacionada ao H1N1, além de dano alveolar difuso (DAD), presente em 83% das mortes⁸.

O H1N1 pandêmico difere do vírus da influenza sazonal na indução exacerbada de respostas pró-inflamatórias em humanos e modelos animais¹⁰. Os mediadores inflamatórios, como as citocinas, contribuem para a inibição da replicação viral, atuando como um quimioatrativo das células imunes, bem como ativando e regulando a resposta imune e adaptativa. Entretanto, a ativação exacerbada de citocinas pode resultar em lesão pulmonar aguda e contribuir para altas taxas de mortalidade¹¹.

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória derivada principalmente de células T ativadas e tem sido associada à inflamação neutrofílica das vias aéreas^{12,13,14,15}. Essa interleucina tem efeitos sobre as células epiteliais humanas, incluindo a estimulação da produção de interleucina-8 (IL-8), que contribui para a exacerbção do recrutamento de neutrófilos induzido pela IL-17¹². Estudos sugerem que o recrutamento de IL-17 e neutrófilos está diretamente associado à lesão pulmonar em pacientes com pandemia de H1N1, assim como a IL-8 está associada à progressão da doença observada em pacientes hospitalizados^{11,16}.

Como o vírus pandêmico H1N1 parece diferir de outros vírus sazonais quanto ao comportamento da resposta imune e, levando em conta a continuidade da circulação global desse vírus, sugere-se estudar o tropismo tecidual viral e a patogênese da doença. Assim, a busca por biomarcadores sanguíneos ou teciduais, que permitam a detecção de indivíduos mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções respiratórias agudas graves das vias aéreas inferiores, é fundamental para a prevenção dessa doença e sua morbidade e mortalidade. Pode também ser útil no estabelecimento de terapia inicial e individualizada em pacientes propensos a um desfecho fatal ou hospitalização prolongada seguida de sequelas respiratórias.

2. Objetivo

Avaliar a expressão tecidual de IL-8 e IL-17 e número de neutrófilos em amostras de pulmão de pacientes que morreram de pneumopatia grave causada pelo vírus pandêmico H1N1, correlacionando com a expressão em casos não pandêmicos.

3. Materiais and Métodos

Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sob o número 2.426.757.

O grupo da pandemia H1N1 compreende amostras pulmonares de necropsias de pacientes cuja causa de morte foi infecção respiratória aguda grave (n = 10) durante a pandemia de 2009. A faixa etária dos pacientes variou de 21 a 61 anos, incluindo ambos os gêneros.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o H1N1 foi realizada em todos os dez pacientes deste estudo. Para a genotipagem da Influenza A em (H1N1) pdm09, utilizou-se a Reação de Transcriptase Reversa, seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR). A amplificação do genoma viral foi realizada com o Kit Quantitativo RT-PCR Invitrogen SuperScriptTMIII Platinum®, que pode sintetizar e amplificar o cDNA em um único protocolo e usar como fluorocromo a sonda TaqMan® ligada ao sistema fluoróforo FAM Fluorescência específica tipo sonda por hidrólise, protocolo fornecido pelo CDC / 2009.

Para o grupo não-pandêmico, foram utilizadas amostras pulmonares de necropsias de pacientes pediátricos, cuja causa de morte foram infecções respiratórias virais agudas não pandêmicas graves (n = 67). De 794 casos de necropsias pediátricas com doença respiratória grave (de 1960 a 2004), 193 blocos fixados em formol fixados em parafina (FFPE) contendo amostras de pulmão em boas condições para a reação imuno-histoquímica foram selecionados para este estudo. Todos os casos foram testados para vírus respiratórios através do protocolo de imunohistoquímica. Anticorpos monoclonais anti-adenovírus (AdV), anti-Parainfluenza 1, 2 e 3 (PI1, PI2, PI3), anti-Influenza A e B (FLUA e FLUB) de LIGHT DIAGNOSTICS™ Kit Respiratório de Screen Viral DFA (CHEMICON International, Inc (Temecula, USA) foram utilizados. Destes 193 casos testados, 68 foram positivos para um ou mais de um vírus respiratório, dos quais 67 foram usados para compor o grupo não-pandêmico deste estudo. A faixa etária deste grupo variou de um mês a 14 anos, incluindo ambos os sexos^{14,15,16}.

Para ambos os grupos, pandemia de H1N1 e não-pandêmico, foi realizada uma busca direta pelos laudos de necropsia e registradas as datas dos óbitos, o gênero e a idade desses pacientes. As datas de óbito foram usadas para definir a sazonalidade que foi dividida em meses quentes e frios. A sobrevida foi definida como o período entre internação / diagnóstico e óbito^{14,15,16}.

Os padrões histopatológicos encontrados nas amostras deste estudo foram revisados nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H & E) e foram classificados como padrão A - broncopneumonia - e padrão B - pneumonite intersticial. As mesmas lâminas de H&E também foram utilizadas para escolha das áreas amostrais utilizadas para a construção do microarranjo tecidual

(TMA) com quatro amostras por caso, sendo duas áreas peribrônquicas e duas áreas periféricas subpleurais. Os blocos de TMA foram utilizados para realizar as reações imuno-histoquímicas^{17,18,19}.

Para verificar a concentração tecidual basal de IL-8 e IL-17, bem como o número de neutrófilos em amostras pulmonares sem alterações patológicas, foram construídos TMAs de dois outros grupos controle: Grupo Controle Basal Adulto (n = 11) e Crianças Grupo Controle Basal (n = 19). Esses grupos foram separados e avaliados da mesma maneira descrita acima para os grupos pandêmicos H1N1 e não-pandêmicos. Eles são compostos de amostras pulmonares de necropsias de pacientes que morreram por várias causas, não envolvendo lesões pulmonares^{17,18,19}. A idade do Grupo Controle Basal das Crianças variou de 2 meses a 13 anos, com ambos os gêneros distribuídos homoganeamente, enquanto a idade do Grupo Controle Basal Adulto variou de 18 a 60 anos, com predomínio de pacientes do sexo masculino, seguindo o grupo pandêmico H1N1.

Para comparar a expressão tecidual de IL-8 e IL-17 e o número de neutrófilos, o grupo não-pandêmico também foi subdividido de acordo com a presença ou ausência de imunopositividade para FLUA e FLUB (Grupo com Vírus da Influenza, n = 23 e Grupo Sem Vírus da Influenza, n = 44). Assim, o Grupo com Vírus da Influenza compreende as amostras que foram imunopositivas para FLUA e B, e o Grupo Sem Influenza por Vírus compreende amostras que foram identificadas com outros tipos virais tais como RSV; AdV; PIV1; PIV2; PIV3.

Ensaio de Imunohistoquímica

A identificação de IL-8 e IL-17 em amostras de TMA foi determinada usando a técnica de imuno-histoquímica, onde foram utilizados anticorpos primários contra estas proteínas (anticorpo policlonal anti-IL-8-coelho, Abcam, Cambridge, UK, diluição 1: 200 e anticorpo policlonal de coelho anti-IL-17, Abcam, Cambridge, Reino Unido, diluição 1: 200). A incubação dos anticorpos primários em câmara úmida, com temperatura entre 2 e 8° C, durante a noite foi realizada. O polímero secundário (Revelar Sistema de Detecção Polyvalent HRP-DAB, Spring Bioscience, CA, EUA) foi incubado com o material durante 25 minutos à temperatura ambiente. Para a visualização da reação o cromógeno, 2, 3, diamino-benzidina + complexo substrato de peróxido de hidrogênio foi adicionado por 3 minutos e após a contrastação foi realizada com hematoxilina de Harris.

Análises das Interleucinas 8 e 17

As lâminas imunomarcadas de TMA foram submetidas ao scanner de lâminas Zeiss Axio Scan Z1 em campo de alta potência (HPF = 40x objetivo) e a expressão tecidual de IL-8 e IL-17 foi medida em porcentagem por 16 HPF, determinada pelo programa de análise morfométrica Image Pro Plus™ 4.5 (Media Cybernetics™ - Rockville, Maryland, EUA) ^{17,18,19}.

Contagem de Neutrófilos

As lâminas coradas em H&E foram submetidas ao scanner de lâminas Zeiss Axio Scan Z1, em HPF, para gerar imagens de alta resolução para realizar as contagens de neutrófilos. As imagens foram selecionadas de acordo com as áreas de maior concentração de neutrófilos na amostra (áreas de hot spot). Dez imagens foram obtidas por caso. A contagem foi realizada utilizando o software scanner Axio Scan Z1 (Carl Zeiss-Oberkochen, Alemanha), onde cada célula encontrada foi marcada para posterior verificação. Os neutrófilos foram contados apenas no septo alveolar. Ao final, obteve-se o número médio de neutrófilos de cada amostra, a fim de realizar a análise estatística comparativa entre os grupos estudados.

Análises estatísticas

Os resultados das variáveis quantitativas foram descritos por média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo. Para variáveis categóricas, foram apresentadas frequências e porcentagens. A comparação de dois grupos, em relação às variáveis quantitativas, foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para analisar a associação entre duas variáveis quantitativas, foi estimado o coeficiente de correlação de Spearman. O teste de Shapiro-Wilk avaliou a normalidade das variáveis. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados utilizando o software IBM SPSS Statistics v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

4. Resultados

As características clínicas dos grupos pandêmicos H1N1 ($n = 10$) e não-pandêmico ($n = 67$) como idade, gênero, sazonalidade, padrões histopatológicos, sobrevivência, expressão tecidual de IL-17 e IL-8 e número de neutrófilos são listados na Tabela 1. Houve predomínio de casos masculinos no grupo pandêmico H1N1. A idade dos pacientes no grupo pandêmico H1N1 variou de 23 a 61 anos, enquanto a idade dos pacientes no grupo não pandêmico variou de 1 mês a 13 anos. Quanto à sazonalidade, a maioria dos casos letais de pneumonia ocorreu durante o período de frio em ambos os grupos, e no grupo pandêmico H1N1 a prevalência nos meses frios foi de 100%. Em relação ao padrão patológico, o grupo H1N1 pandêmico apresentou 100% dos casos com padrão de pneumonite intersticial. No grupo não-pandêmico, a porcentagem para o mesmo padrão patológico foi de cerca de 73%. Quanto à sobrevivência, o grupo pandêmico H1N1 apresentou tempo médio de internação de até 4,7 dias, significativamente menor quando comparado ao grupo não pandêmico, que foi de 12,87 dias (Tabela 1).

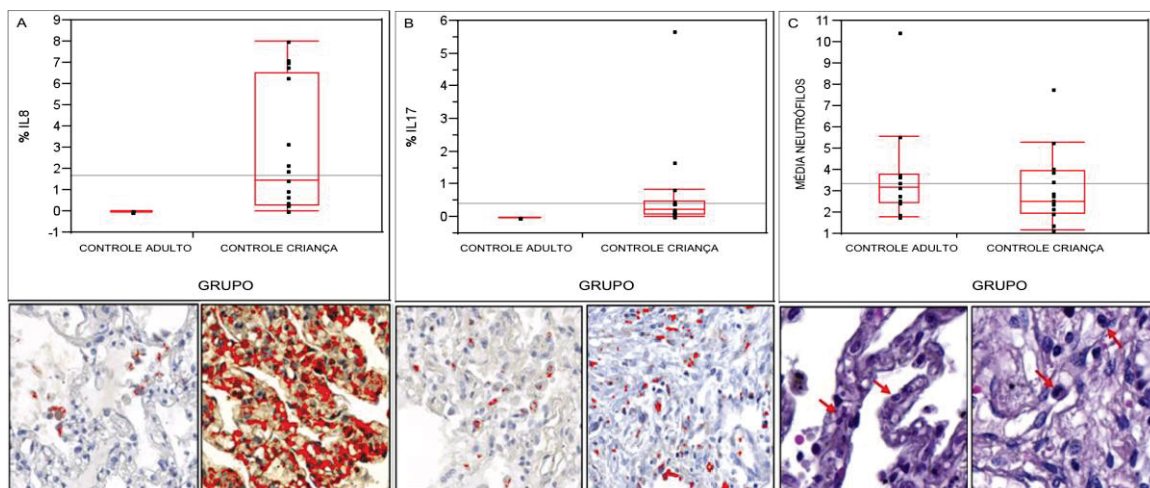
Em relação à expressão tecidual de IL-8 e IL-17 e ao número de neutrófilos, o grupo pandêmico H1N1 apresentou percentuais estatisticamente maiores dessas três variáveis quando comparado ao grupo não-pandêmico (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre grupos pandêmicos H1N1 e não-pandêmicos de acordo com os achados clínicos e anatomopatológicos.

Dados	Variáveis	H1N1 Pandêmico n = 10	Não-pandêmico n = 67	Valor de p
Gênero	Masculino	80.0%	50.7%	-----
	Feminino	20.0%	49.3%	-----
Idade (anos)¹	-----	43.5/44 (23-61)	1.6/0.583 (0.083-13)	<0.001[†]
Sazonalidade	Frio	100.0%	64.7%	-----
	Quente	0%	35.3%	-----
Padrão Histopatológico	Pneumonite Intersticial	100.0%	73.5%	-----
	Broncopneumonia	0%	26.5%	-----
Sobrevida (dias)¹	-----	4.70/1.5 (1-19)	12.87/10 (2-32)	0.001[†]
Expressão tecidual de IL-8^{1,2}	-----	4.15/4.13 (0.72-9.13)	1.59/1.45 (0.64-3.73)	0.003[†]
Expressão tecidual de IL-17^{1,2}	-----	9.91/9.73 (4.34-15.44)	3.61/2.44 (0.02-12.00)	<0.001[†]
Número de neutrófilos^{1,3}	-----	17.6/16.7 (11.4-25.8)	7.2/4.3 (0.20-39.1)	<0.001[†]

¹- média de imunopositividade (%) em 16 HPF; ²- media do número em 10HPF; [†] Teste não paramétrico de Mann-Whitney, p<0.05.

A expressão tecidual de IL-8, IL-17 e o número de neutrófilos do grupo controle basal (adulto / crianças), como mostrado na figura 1.



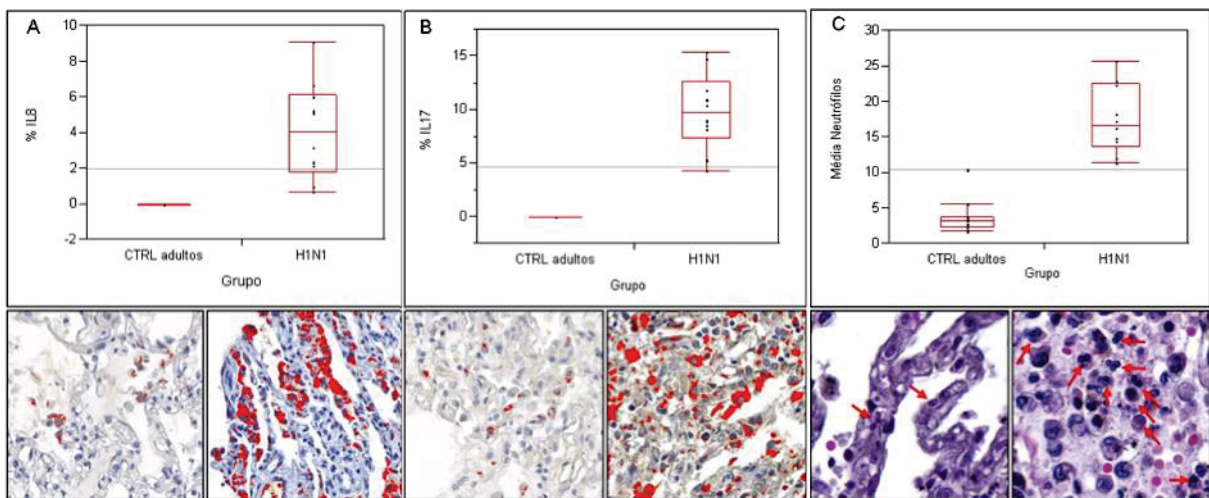
*Non-parametric test of Mann-Whitney, p<0.05.

Figura 1. Gráficos comparativos entre os grupos controle adulto e pediátrico para IL8, IL17 e contagem de neutrófilos. Abaixo de cada gráfico estão as imagens pulmonares do grupo controle adulto e do grupo controle pediátrico,

respectivamente, com o marcador vermelho de leitura de positividade do software Image ProPlus®. Na contagem de neutrófilos (C), as setas vermelhas correspondem aos neutrófilos encontrados no tecido pulmonar.

A expressão tecidual de IL-8, IL-17 e o número de neutrófilos dos grupos pandêmicos H1N1 e não-pandêmicos foram comparados ao grupo controle basal similar (adulto / crianças), como mostrado nas figuras 2 e 3.

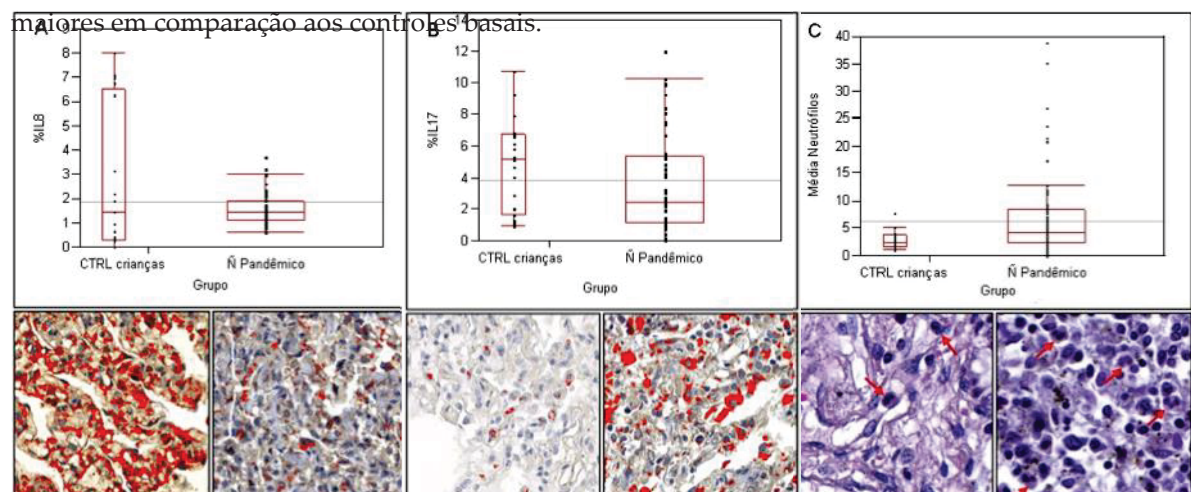
A Figura 2 compara os resultados de expressão tecidual de IL-8, IL-17 e número de neutrófilos do grupo H1N1 pandêmico com o grupo controle basal adulto. Tanto a expressão de interleucina quanto o número de neutrófilos tiveram resultados significativamente superiores aos controles basais.



*Teste Não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0.05$.

Figura 2. Gráficos comparativos entre os grupos pandêmicos H1N1 e controle adulto quanto à contagem de IL8, IL17 e neutrófilos. Abaixo de cada gráfico estão as imagens pulmonares do grupo Controle Adulto e do grupo pandêmico H1N1, respectivamente, com o marcador vermelho de leitura de positividade do software Image ProPlus®. Na imagem da contagem de neutrófilos (C), as setas vermelhas correspondem aos neutrófilos encontrados no tecido pulmonar.

A Figura 3 mostra os gráficos comparativos dos resultados da expressão tecidual de IL-8 e IL-17 e do número de neutrófilos do grupo não-pandêmico com o grupo controle basal de crianças. A expressão tecidual da IL-17 e o número de neutrófilos foram estatisticamente significativamente



*Teste Não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0.05$.

Figura 3 (A, B, C). Gráfico comparativo entre os grupos de crianças não pandêmicas e controle basal, quanto à contagem de IL8, IL17 e neutrófilos. Abaixo as imagens de controles e não-pandêmico, respectivamente, com a positividade do software Image ProPlus®, a leitura do marcador vermelho. Na contagem de contagem de neutrófilos (C), as setas vermelhas correspondem aos neutrófilos encontrados no tecido pulmonar.

A fim de identificar o possível efeito da presença do vírus Influenza na expressão tecidual de IL-8 e IL-17, e no número de neutrófilos, o grupo não-pandêmico foi subdividido em dois subgrupos de acordo com a presença ou ausência de Vírus da Gripe A ou B em imuno-histoquímica (com Influenza e sem Influenza). Esses dois novos subgrupos não-pandêmicos foram comparados ao grupo pandêmico H1N1, como mostra a Tabela 2. A expressão tecidual de IL-8 e IL-17 e o número de neutrófilos da pandemia H1N1 apresentaram valores estatisticamente maiores quando comparados aos dois subgrupos não-pandêmicos. Quando os dois subgrupos não-pandêmicos (com e sem influenza) foram comparados para a expressão tecidual de IL-8 e IL-17, bem como para o número de neutrófilos, não foi observada diferença significativa. Além disso, foi observada uma diminuição nas taxas de sobrevivência do grupo H1N1 pandêmico em relação aos dois subgrupos não-pandêmicos (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação dos casos de grupos pandêmicos H1N1 com grupos não pandêmicos subdivididos em dois grupos com e sem a presença do vírus Influenza, considerando as variáveis IL-8, IL-17, contagem de neutrófilos e taxa de sobrevida.

Variável	Influenza	N	Mediana (Min/Max)	Valor de p
Expressão tecidual de IL-8¹	SEM	36	1.40 (0.65-3.24)	
	COM	22	1.62 (0.64-3.73)	0,010 [†]
	pH1N1	10	4.13 (0.72-9.13)	
Expressão tecidual de IL-17¹	SEM	40	2.26 (0.02-12.00)	
	COM	22	3.91 (0.51-10.31)	<0,001 [†]
	pH1N1	10	9.73 (4.34-15.44)	
Número de Neutrófilos²	SEM	38	4.30 (0.50-39.1)	
	COM	22	4.10 (0.20-35.4)	<0,001 [†]
	pH1N1	10	16.7 (11.4-25.8)	

	SEM	44	10 (2-30)	
Sobrevida (dias)	COM	23	10 (5-32)	0,001†
	pH1N1	10	1,5 (1-19)	

¹-média de imunopositividade (%) in 16 HPF; ²-média do número em 10HPF; †Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, p<0.05

A fim de minimizar o possível efeito do tempo de sobrevida na expressão tecidual de IL-8 e IL-17, e no número de neutrófilos, os grupos pandêmicos H1N1 e não-pandêmicos foram pareados pelo tempo de sobrevida, com apenas casos com sobrevida até 7 dias foram utilizados nesta análise (Tabela 3). Observou-se que os resultados foram mantidos, a expressão tecidual de IL-8 e IL17 e o número de neutrófilos foram significativamente maiores no grupo pandêmico H1N1.

Tabela 3. Comparação entre grupos pandêmicos H1N1 e não-pandêmicos com até 7 dias de sobrevida relacionados à expressão de IL-8, IL-17 e contagem de neutrófilos.

Dados	H1N1 Pandêmico (N=8)	Não-pandêmico (N=10)	Valor de p
Sobrevida (dias)¹	2/1 (1-6)	6.20/ 7.00 (2-7)	0.001†
Expressão tecidual de IL-8^{1,2}	4.78/5.07 (0.72-9.13)	1.68/1.65 (1.65-2.61)	0.021†
Expressão tecidual de IL-17^{1,2}	9.99/9.73 (5.33-15.44)	2.85/3.28 (0.05-4.63)	<0.001†
Número de neutrófilos^{1,3}	16.88/16.70 (11.4-23.00)	3.06/2.10 (0.20-8.20)	<0.001†

¹-Média/Mediana (Min-Max); ²- Média de imunopositividade (%) in 16 HPF; ³- média do número em 10HPF; † Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, p<0.05.

O tempo de sobrevida dos pacientes também foi comparado com as curvas de expressão tecidual de IL-17 e IL-8 e o número de neutrófilos. Houve uma correlação inversa do tempo de sobrevida, no grupo pandêmico H1N1, com a expressão de IL-8 (coeficiente de correlação de Spearman -0,64, p = 0,046 - dados não mostrados).

5. Discussão e Conclusões

As infecções do trato respiratório inferior são responsáveis por 90% das mortes por doenças respiratórias e 10% do total de mortes de crianças menores de um ano de idade²⁰. Esses dados

corroboram os achados do estudo em questão, em que a faixa etária acometida por doenças respiratórias causadas por vários tipos virais, e com alta letalidade, foi a primeira infância.

A pneumonia viral pode ser uma consequência de infecções que se originam no próprio trato respiratório superior e progridem para o trato respiratório inferior, como nas infecções respiratórias causadas pelo Influenza, além de outros vírus⁷. O vírus pandêmico H1N1 de 2009 (cepa do vírus pandêmico de 2009) tem alta transmissibilidade, um curto período de incubação e altas taxas de morbidade e mortalidade²¹. Eles são responsáveis por epidemias recorrentes devido a mudanças substanciais na antigenicidade e alta patogenicidade^{22,23}. Essas alterações na antigenicidade e a alta virulência demonstrada nos casos da pandemia de 2009 podem ser responsáveis pelo alcance e que correspondem às amostras desta pesquisa, uma vez que são adultos jovens sem fatores de risco pré-determinados. A alta patogenicidade do vírus também pode estar associada a menores índices de sobrevivência de pacientes infectados com H1N1 (média = 4,7 dias) em comparação com os pacientes infectados por vírus não-pandêmicos (média = 12,9 dias) neste estudo ($p = 0,001$) (Tabela 1).

O estudo dos grupos controle de adultos e crianças revelou uma expressão tecidual basal de ambas as interleucinas estudadas e a contagem de neutrófilos. Além disso, observou-se que a expressão basal das interleucinas 8 e 17 foi maior no grupo controle infantil do que no recrutamento neutrofílico, como mostrado na figura 1 (A, B, C).

Esse assunto é relativamente controverso, mas a maior parte dos artigos relatam que as crianças secretam mais interleucinas, tanto pro como anti inflamatórias, do que os adultos, sem no entanto produzirem lesões e efeitos mais letais^{24,25,26,27}. Este fato pode ser devido à imaturidade de outros sistemas relacionados à imunidade adquirida.

Neste estudo, os autores avaliaram a expressão de IL-17 e sua relação com a expressão de IL-8 e, conseqüentemente, o recrutamento de neutrófilos para melhor avaliar a eficácia da IL-17 e seu poder de produzir lesões graves na pneumonia pandêmica. Em resposta a uma infecção viral, tanto a IL-8 quanto a IL-17 são secretadas por macrófagos e células T para recrutar novas células, incluindo neutrófilos, para defender o hospedeiro²⁸. Portanto, essas interleucinas devem ter níveis aumentados apenas em amostras de pulmão infectado. Os achados deste estudo corroboram com a literatura, pois houve aumento na expressão de interleucinas e no número de neutrófilos nos grupos pandêmicos H1N1 e não-pandêmico em comparação com os grupos controle basal (Figuras 2 e 3). Este resultado é em resposta a uma infecção pulmonar, os macrófagos alveolares liberam quimiocinas, incluindo IL-8 e IL-17, atraindo neutrófilos. Embora a presença de neutrófilos seja vital para a defesa do hospedeiro, a ativação excessiva leva a graves danos teciduais pela liberação de agentes citotóxicos como oxigênio reativo e proteinases²⁹. Neste estudo, a contagem de neutrófilos acompanhou o aumento da expressão

tecidual das interleucinas 17 e 8, e pôde comprovar sua efetividade, de forma que, quando sua presença aumentou, o número de neutrófilos no tecido também foi maior.

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que tem sido associada à inflamação neutrofílica das vias aéreas^{13,30,31} e, por esse motivo, pode estar aumentada em estado inflamatório agudo. Por ser freqüentemente detectada na expectoração de pacientes com asma e bronquite, correlacionou-se com a hiperreatividade das vias aéreas¹⁴. Neste trabalho, a IL-17 demonstrou aumento da expressão tecidual no grupo pandêmico H1N1, em relação ao grupo não pandêmico (9,9% vs. 3,6%; $p < 0,001$) (Tabela 1). Estes dados foram corroborados por outros estudos sobre a resposta mediada por Th17, aumento do status em amostras de soro de pacientes infectados com o vírus da influenza pandêmica^{32,33,34}.

Em condições normais, após 6-12 horas de circulação, os neutrófilos sofrem apoptose, mas no estado inflamatório a apoptose é inibida e a presença de IL-8 parece ser responsável por esse processo^{29,30}. Além de recrutar e retardar a apoptose de neutrófilos, a IL-8 é um potente ativador de neutrófilos. No presente estudo, a IL-8 apresentou aumento significativo no grupo pandêmico H1N1 comparado ao grupo não pandêmico (4,2% vs. 1,6%; $p = 0,003$) (Tabela 1). O aumento do número de neutrófilos nas amostras do grupo pandêmico demonstra que as interleucinas, com aumento da expressão tecidual nesse grupo, foram efetivas e eventualmente exacerbaram o recrutamento dessas células. Em pacientes com doença respiratória, a exacerbação aguda é uma condição resistente do processo inflamatório. Essa exacerbação é desencadeada principalmente pela infecção e ativação de células e mediadores inflamatórios, estando a IL-8 associada à IL-17 os mediadores de neutrófilos e quimioatrativos das células do epitélio brônquico. Um estudo demonstrou que essas citocinas e a quimioatração neutrofílica podem estar associadas à patogênese das doenças respiratórias pela exacerbação da resposta inflamatória³⁴.

No grupo pandêmico H1N1, a presença de neutrófilos foi significativamente maior do que no grupo não-pandêmico (17,6% vs. 7,2%; $p < 0,001$), o que parece estar relacionado à intensa ativação pró-inflamatória (Tabela 1). A ação dos neutrófilos na infecção já é conhecida e esta ação é muito evidente na infecção pulmonar. Estudos recentes demonstram que variantes virais da influenza A podem desencadear respostas mais severas e que a resposta neutrofílica parece ser determinante na patogenicidade e no resultado final da infecção viral^{35,36}.

Uma limitação deste estudo é que os autores comparam pneumonias não-pandêmicas em crianças com casos de H1N1 em adultos. Entretanto, grupos controle com expressões basais foram incluídos para minimizar este efeito e demonstrar que as crianças são capazes de secretar interleucinas com valores maiores que os adultos.

Sabe-se que o vírus pandêmico da influenza A (pmd09) promoveu uma resposta diferente daquela observada nas infecções sazonais causadas pelo mesmo vírus. Portanto, o grupo não-

pandêmico foi subdividido em com e sem influenza para comparação com a Influenza pdm09, como evidenciado na tabela 2. Em todas as situações testadas, o grupo pandêmico apresentou uma resposta aumentada em relação à não-pandêmica em ambos os subgrupos. E esse fato apenas reforça a virulência e alta patogenicidade da cepa pandêmica e que isso não se deve ao fato deste vírus ser influenza, já que não houve diferença significativa na expressão tecidual das citocinas quando comparados os subgrupos com e sem Influenza. Outros estudos também demonstraram um aumento na resposta inflamatória dessa cepa pandêmica, corroborando nossos achados^{35,37,38}.

Dentre os fatores que poderiam influenciar a ação das citocinas inflamatórias, o tempo de internação ocuparia uma posição importante nesse cenário, portanto os grupos pandêmicos e não-pandêmicos foram pareados de acordo com o tempo de sobrevida de até 7 dias. No entanto, não houve alteração na significância dos dados encontrados no grupo H1N1, mantendo a intensa diferença na expressão de citocinas no grupo pandêmico. Chan et al., 2018 avaliaram a resposta inflamatória à infecção pelo Influenza A (H1N1) pdm09 em comparação ao Vírus Sincicial Respiratório (VSR) onde a Influenza A (H1N1) pdm09 induziu níveis mais altos de citocinas, quimiocinas e mediadores imunológicos pró-inflamatórios, o que reforça nossos achados .

Com relação ao tempo de sobrevida dos casos de H1N1 pdm09 neste estudo, foi encontrada uma correlação inversa do tempo de sobrevida com a expressão de IL-8 e os casos com maior expressão tecidual dessa interleucina apresentaram menor tempo de sobrevida. Dados semelhantes foram encontrados em um estudo que quantificou os níveis plasmáticos de várias citocinas inflamatórias em pacientes infectados com H1N1 e IL8 também foi a citocina associada a menor tempo de sobrevida³⁹. Esse achado pode estar relacionado à ação da IL-8 na resposta inflamatória como quimioatrativo, recrutador e ativador especial de neutrófilos, e ao fato dessa resposta estar aumentada em infecções virais³⁶.

Baseado em todas essas informações, o vírus H1N1 pandêmico, que circulou em 2009, parece ter alta virulência e, portanto, causa uma resposta exacerbada do sistema imunológico do hospedeiro. Essa resposta exagerada é caracterizada principalmente pela presença de neutrófilos em quantidade superior ao esperado, e o aumento da secreção de IL-8 devido ao estado inflamatório parece prolongar a presença dessas células no local da lesão. Os neutrófilos eventualmente aumentam a lesão pulmonar, resultando em piora da condição do paciente e, conseqüentemente, diminuição do tempo de sobrevida.

6. Patentes

Aprovação em comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sob o número 2.426.757.

Consentimento para publicação

Não aplicável

Disponibilidade de dados e material

Todos os dados que apóiam os resultados deste estudo estão disponíveis no artigo.

Interesses competitivos

Os autores declaram não ter interesses conflitantes.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela pesquisa de produtividade nível 2 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Contribuição dos autores

MLVA realizou a imunohistoquímica, foi responsável pela análise e interpretação dos dados e redigiu o manuscrito. MASM analisou os dados e contribuiu para a redação do manuscrito e CBVP é um aluno de doutorado do nosso grupo e apoio em todos os experimentos e redação do artigo. CMS auxiliado com dados de análise estatística, contribuiu para a redação do manuscrito e as tabelas de resultados. O VHCJ forneceu os registros médicos com os dados necessários para análise. A SMR foi responsável pela coleta e preparação de amostras de pacientes e PCR para confirmar a presença do vírus. KOG, TTSK, ALGG, GTG e LCB são estudantes de graduação e forneceram suporte operacional. O LN supervisionou o projeto e foi um dos principais contribuintes na redação do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Sr. Seigo Nagashima por sua assistência na obtenção e preparação das fotos, e Dra. Márcia Olandoski pela realização da análise estatística.

7. Referências

1. Straliotto SM, Siqueira MM, Muller RI, Fischer GB, Cunha MI, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(4): 283-291.
2. Silva DC, Zavadniak AF, Dias JR, Rosário Filho NA. Asma e atopia em crianças com infecção anterior pelo vírus respiratório sincicial. *J Paranaense Pediatría.* 2001; 2: 38-41.
3. WHO. Pneumonia: The forgotten killer of children. Geneva, The United Nations Children's Fund (UNICEF)/ World Health Organization (WHO), 2006. Available from: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9280640489/en/
4. Cilloniz C, Martin-Loeches I, Garcia-Vidal C, San Jose A, Torres A. Microbial etiology of pneumonia: epidemiology, diagnosis and resistance patterns. *Int J Mol Sci* 2016; 17: pii E2120. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2120>
5. The UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation . Levels & Trends in Child Mortality: Report 2014. New York: UNICEF; 2014.
6. Forum of International Respiratory Societies. The Global Impact of Respiratory Disease – Second Edition. She eld, European Respiratory Society, 2017. Available from: https://www.who.int/gard/publications/The_Global_Impact_of_Respiratory_Disease.pdf
7. Knott AM, Long CE, Hall CB. Parainfluenza viral infections in pediatrics outpatients: seasonal patterns and clinical characteristics. *Pediatr Infect Dis J.* 1994; 13: 269-273.
8. Rodriguez-Ramirez HG, Salinas-Carmona MC, Barboza-Quintana O, Garza AM, Falcon LAC, Rangel-Martinez LM, Rosas-Taraco AG. CD206+ Cell Number Differentiates Influenza A (H1N1) pdm09 from Seasonal Influenza A Virus in Fatal Cases. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 921054. doi: 10.1155/2014/921054.
9. Shrestha SS, Swerdlow DL, Borse RH, Prabhu VS, Finelli L, Atkins CY, Owusu-Edusei K, Bell B, Mead PS, Biggerstaff M, Brammer L, Davidson H, Jernigan D, Jhung MA, Kamimoto LA, Merlin TL, Nowell M, Reed SC, Reed C, Schuchat A, Meltzer MI. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009-April 2010). *Clin Infect Dis.* 2011; 52 Suppl 1: S75-82.
10. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature.* 2009; 460(7258): 1021-1025.

11. Rendo'n-Ramirez EJ, Ortiz-Stern A, Martinez-Mejia C, Salinas-Carmona MC, Rendon A, Mata-Tijerina VL, Rosas-Taraco AG. TGF- β Blood Levels Distinguish Between Influenza A (H1N1) pdm09 Virus Sepsis and Sepsis due to Other Forms of Community-Acquired Pneumonia. *Viral Immunol.* 2015; 28 (5): 248-254. doi: 10.1089/vim.2014.0123.
12. Wiehler S, Proud D. Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 2007; 293(2): 505-515.
13. Fujita J, Kawaguchi M, Kokubu F, Ohara G, Ota K, Huang S-K, et al. Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells. *Allergy.* 2012; 67(6): 744-750.
14. Barlow JL, Flynn RJ, Ballantyne SJ, McKenzie a NJ. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41(10): 1447-1455.
15. Wang JP, Bowen GN, Padden C, Cerny A, Finberg RW, Newburger PE, Kurt-Jones EA. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood.* 2008; 112(5): 2028-2034. doi: 10.1182/blood-2008-01-132860.
16. Lidén A, Hoshino H, & Laan M. Airway neutrophilia and interleukin-17. *Eur Respir J.* 2000; 15: 973-977.
17. do Carmo Debur M, Raboni SM, Flizikowski FB, Chong DC, Persicote AP, Nogueira MB, Rosele LV, de Almeida SM, de Noronha L. Immunohistochemical assessment of respiratory viruses in necropsy samples from lethal non-pandemic seasonal respiratory infections. *J Clin Pathol.* 2010; 63(10): 930-934.
18. Chong DC, Raboni SM, Abujamra KB, Marani DM, Nogueira MB, Tsuchiya LR, Neto HJ, Flizikowski FB, de Noronha L. Respiratory viruses in pediatric necropsies: an immunohistochemical study. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12(3): 211-216.
19. Souza Costa VH Jr, Baurakiades E, Viola Azevedo ML, Traiano G, Kowal Rosales J, Kunze Larsen KS, Raboni SM, de Noronha L. Immunohistochemistry analysis of pulmonary infiltrates in necropsy samples of children with non-pandemic lethal respiratory infections. *J Clin Virol.* 2014; 61(2): 211-215.)
20. Kaneko M, Watanabe J, Kuwahara M, Ueno E. Impact of respiratory syncytial virus infections as a cause of lower respiratory tract infections in children younger than 3 years of age in Japan. *J Infect.* 2002; 44(4): 240-243.
21. Belucci TR, Marra AR, Edmond MB, Pinho JRR, Yokota PKO, Mafra ACCN, Dos Santos OFP. Evaluation of Influenza A H1N1 infection and antiviral utilization in a tertiary care hospital. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1): 579. doi: 10.1186/s12879-018-3492-z.
22. Chatzopoulou F, Gioula G, Kioumis I, Chatzidimitriou D, Exindari M. Identification of complement-related host genetic risk factors associated with influenza A (H1N1) pdm09 outcome: challenges ahead. *Med Microbiol Immunol.* 2018. doi: 10.1007/s00430-018-0567-9.
23. Tate MD, Ioannidis LJ, Croker B, Brown LE, Brooks AG, Reading PC. The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice. *PLoS One.* 2011; 6(3): e17618. doi: 10.1371/journal.pone.0017618.
24. Randolph AG, McCulloh RJ. Pediatric sepsis: important considerations for diagnosing and managing severe infections in infants, children, and adolescents. *Virulence.* 2014; 5(1): 179-189. doi: 10.4161/viru.27045.
25. Hall MW, Geyer SM, Guo CY, Panoskaltis-Mortari A, Jovet P, Ferdinands J, Shay DK, Nateri J, Greathouse K, Sullivan R, Tran T, Keisling S, Randolph AG. Innate immune function and mortality in critically ill children with influenza: a multicenter study. *Crit Care Med.* 2013; 41(1): 224-236. doi: 10.1097/CCM.0b013e318267633c.
26. Wheeler DS, Wong HR, Zingarelli B. Pediatric Sepsis - Part I: "Children are not small adults!". *Open Inflamm J.* 2011; 7;4: 4-15. doi:10.2174/1875 041901104010004
27. Barsness KA, Bensard DD, Partrick DA, Calkins CM, Hendrickson RJ, Banerjee A, McIntyre RC Jr. IL-1 β induces an exaggerated pro- and anti-inflammatory response in peritoneal macrophages of children compared with adults. *Pediatr Surg Int.* 2004; 20(4): 238-242. doi: 10.1007/s00383-003-1118-y
28. Nathan C. Neutrophils and Immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(3): 173-182. doi: 10.1038/nri1785.
29. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med.* 2011; 17(3-4): 293-307. doi: 10.2119/molmed.2010.00138.
30. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 2008; 13: 2400-2407.
31. Wong CK, Cao J, Yin YB, Lam CWK. Interleukin-17A activation on bronchial epithelium and basophils: a novel inflammatory mechanism. *Eur Respir J.* 2010; 35(4): 883-893.
32. Li C, Yang P, Sun Y, Li T, Wang C, et al. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Cell Res.* 2012; 22(3):528-38. doi: 10.1038/cr.2011.165.
33. McAleer JP, Kolls JK. Directing traffic: IL-17 and IL 22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol Rev.* 2014; 260(1):129-44. doi: 10.1111/imr.12183.
34. Song X, He X, Li X, Qian Y. The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity. *Cell Mol Immunol.* 2016; 13(4):418-31. doi: 10.1038/cmi.2015.105.

35. Vidy A, Maisonnasse P, Da Costa B, Delmas B, Chevalier C, Le Goffic R. The Influenza Virus Protein PB1 F2 Increases Viral Pathogenesis through Neutrophil Recruitment and NK Cells Inhibition. *PLoS One*. 2016; 11(10): e0165361. doi: 10.1371/journal.pone.0165361.
36. Galani IE, Andreakos E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *J Leukoc Biol*. 2015; 98(4):557-64. doi: 10.1189/jlb.4VMR1114-555R.
37. Lee NI, Wong CK, Chan PK, Chan MC, Wong RY, Lun SW, Ngai KL, Lui GC, Wong BC, Lee SK, Choi KW, Hui DS. Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among hospitalized adults. *PLoS One*. 2011; 6(10):e26050. doi: 10.1371/journal.pone.0026050.
38. Wang SM, Liao YT, Hu YS, Ho TS, Shen CF, Wang JR, Lin YS, Liu CC. Immunophenotype expressions and cytokine profiles of influenza A H1N1 virus infection in pediatric patients in 2009. *Dis Markers*. 2014; 2014:195453. doi: 10.1155/2014/195453.
39. Chan KF, Carolan LA, Korenkov D, Druce J, McCaw J, Reading PC, Barr IG, Laurie KL. Investigating Viral Interference Between Influenza A Virus and Human Respiratory Syncytial Virus in a Ferret Model of Infection. *J Infect Dis*. 2018; 218(3): 406-417. doi: 10.1093/infdis/jiy184.
40. Rondina MT1, Tatsumi K, Bastarache JA, Mackman N. Microvesicle Tissue Factor Activity and Interleukin 8 Levels are Associated with Mortality in Patients with Influenza A/H1N1 Infection. *Crit Care Med*. 2016; 44(7):e574-8. doi: 10.1097/CCM.0000000000001584.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há muito se sabe que as infecções das vias aéreas são causa importante de morbi-mortalidade em todo mundo, sobretudo na primeira infância. São várias as causas de agravamento da doença, como a patogenicidade do agente causador, mas também a forma e a intensidade da resposta imune frente à infecção.

O estudo dessa tese se concentrou na resposta celular dos neutrófilos e nas interleucinas com eles envolvidas, especialmente a IL-17, frente a infecções virais do trato respiratório, com ênfase no Influenza A, subtipo envolvido na pandemia de 2009.

O primeiro artigo demonstrou um aumento significativo da presença de IL-17 no tecido pulmonar de pacientes com infecção por *Influenza A*, quando comparado às outras infecções virais não pandêmicas. Esse achado foi a motivação para estudarmos amostras pulmonares de pacientes que foram á óbito durante a pandemia de 2009 (*Influenza A H1N1pmd*). Neste segundo estudo observamos que o H1N1 foi responsável por um aumento ainda maior de expressão tecidual pulmonar de IL-17 quando comparado aos casos de Influenza A não pandêmico. Este aumento de expressão de IL-17 em amostras pulmonares de pacientes com H1N1 também foram seguidos por uma maior expressão de IL-8 e de contagem neutrofílica, sugerindo uma efetividade da interleucina estudada.

Os dois estudos se completaram na evolução da investigação da resposta do hospedeiro frente a infecção viral, particularmente no que diz respeito à pandemia causada pelo H1N1pmd. As infecções de vias aéreas sazonais costumam evoluir mal, culminando em óbito, em geral na faixa etária até os 14 anos, que compreendem as amostras do grupo controle. No entanto, a pandemia causada pelo H1N1pmd em 2009, causou complicações irreversíveis em adultos jovens. Por essa razão, era impossível parear as amostras cuja causa do óbito tenha sido infecção viral com acometimento de vias aéreas, pela faixa etária dos pacientes. Sendo assim, houveram diferenças, que inicialmente encaramos como limitações, principalmente na dificuldade de parear as amostras por faixa etária, mas que no decorrer dos resultados entendemos como características de cada população. Entretanto, os resultados dos grupos controle adulto e criança revelaram uma expressão tecidual basal de ambas as interleucinas estudadas maior no grupo controle criança não acompanhada do efetivo recrutamento neutrofílico. Este assunto é relativamente controverso, porém a maioria dos artigos relata que crianças secretam mais interleucinas, tanto pró como anti-inflamatórias, do que os adultos, sem entretanto, produzirem lesões e efeitos mais letais. Este fato pode ser devido a imaturidade de outros sistemas relacionados à imunidade adquirida.

Porém, diferente do que foi visto nos grupos controles, quando comparamos a expressão basal de interleucinas 8 e 17 nas crianças deste estudo com a expressão nos casos não pandêmicos, observamos valores maiores no último grupo. E quando comparamos esses últimos com os valores de expressão tecidual nos casos pandêmicos, estes são ainda maiores. O mesmo aconteceu com a contagem de neutrófilos. Sendo assim, mesmo o grupo controle crianças produzindo um basal relativamente alto de interleucinas, o grupo H1N1 foi capaz de produzir um efeito ainda maior seguido de recrutamento neutrofílico. Este fato pode sugerir que estas comparações possam ser analisadas e consideradas, talvez diminuindo o efeito de limitação anteriormente proposto.

Na literatura há menções sobre o receptor da IL-17 cuja diminuição da expressão estaria associada a menor morbidade do paciente, o que pode ser um importante alvo de prognóstico. Com base nisso, temos como perspectivas de continuidade desse estudo, verificar a presença do receptor de IL-17 e sua relação com a morbidade do paciente e ainda genotipar estes pacientes para o gene da IL-17 e do receptor da mesma.

6 CONCLUSÃO

No que diz respeito à caracterização da amostra, o grupo das amostras de pacientes acometidos por infecção causada pelos vírus sazonais não apresentou diferença significativa quanto ao gênero, sendo distribuído uniformemente; a faixa etária variou dos 0 aos 13 anos e o padrão histopatológico predominante foi de broncopneumonia. Quanto ao grupo correspondente às amostras infectadas pelo pH1N1, o sexo masculino foi predominante, a faixa etária variou de 23 a 61 anos e o padrão histopatológico foi de pneumonite intersticial na sua totalidade.

A expressão de todas as interleucinas testadas, bem como do número de neutrófilos, apresentou resultado significativamente maior no grupo pandêmico comparado as amostras do grupo não pandêmico. A interleucina 17 foi a que obteve o resultado mais significativo, cerca de 3 vezes mais no grupo H1N1, seguida da contagem de neutrófilos que foi pouco mais que o dobro no grupo H1N1 em relação ao não-pandêmico.

Quando as amostras do experimento foram comparadas com os grupos basais, ou seja, aquele contendo amostras de pulmão saudável, a diferença de expressão e contagem foi absolutamente significante, sendo aumentada no grupo H1N1 com relação ao grupo adultos basal e do grupo não-pandêmico com relação ao grupo crianças basal.

Já que o vírus H1N1 causador da pandemia de 2009 é um vírus Influenza, este estudo comparou os resultados obtidos no grupo pandêmico, com os resultados do grupo não-pandêmico divididos em com ou sem Influenza, na intenção de verificar se gênero Influenza por si só seria o responsável pelo aumento da expressão das interleucinas. O resultado obtido apontou diferença significativamente maior de expressão tecidual das interleucinas e da contagem neutrofílica no grupo Influenza A pandêmico quando comparado tanto ao grupo não-pandêmico sem influenza quanto no grupo não-pandêmico com influenza. Ainda quando os grupos com e sem influenza dentro do grupo não-pandêmico foi comparado entre si, não houve diferença significativa nos resultados.

Os neutrófilos são células na primeira linha de defesa frente à infecções, sobretudo as que acometem o sistema respiratório. Dentre as suas atribuições, está a secreção de interleucinas pró-inflamatórias, que por vezes acabam por

retroalimentar a resposta, recrutando mais neutrófilos para o local de lesão. Dentre essas interleucinas estão principalmente a IL-8 e a IL-17, que tiveram sua expressão significativamente aumentada nas amostras do grupo pandêmico com relação ao não-pandêmico. Esse dado condiz com a maior contagem de neutrófilos no grupo pandêmico, e portanto demonstra a efetividade das interleucinas no que diz respeito ao recrutamento destas células para o local de lesão.

7 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Allen TC, Kurdowska A. Interleukin 8 and acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med.* 2014; 138(2): 266-269. doi: 10.5858/arpa.2013-0182-RA.

Ashman Ik. The biology of stem cell factor and its receptor ckit. *Int J Biochem Cell Boil.* 1999; 31(10): 1037-1051.

Barlow JL, Flynn RJ, Ballantyne SJ, McKenzie a NJ. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41(10): 1447–1455.

Baurakiades E, Costa VH Jr, Raboni SM, de Almeida VR, Larsen KS, Kohler JN, Gozzo Pdo C, Klassen G, Manica GC, de Noronha L. The roles of ADAM33, ADAM28, IL-13 and IL-4 in the development of lung injuries in children with lethal non-pandemic acute infectious pneumonia. *J Clin Virol.* 2014; 61(4): 585-589.

Belucci TR, Marra AR, Edmond MB, Pinho JRR, Yokota PKO, Mafra ACCN, Dos Santos OFP. Evaluation of Influenza A H1N1 infection and antiviral utilization in a tertiary care hospital. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1): 579. doi: 10.1186/s12879-018-3492-z.

Bhatnagar J1, Jones T, Blau DM, Shieh WJ, Paddock CD, Drew C, Denison AM, Rollin DC, Patel M, Zaki SR. Localization of pandemic 2009 H1N1 influenza A vírus RNA in lung and lymphnodes of fatal influenza cases by in situ hybridiza tion: new insights on virus replication and pathogenesis. *J Clin Virol.* 2013; 56 (3):232-7.

Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* 2011; 32(8): 350-357. doi:10.1016/j.it.2011.04. 009.

Bridges LC, Sheppard D, Bowditch RD. Adam disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7. *Biochem J.* 2005; 387: 101-108.

Bruder D, Sriatkhachion A, Enelow RI. Cellular immunity and lung injury in respiratory vírus infection. *Viral Immunol* 2006; 19(2): 147-155.

Bueno SM, Gonzáles PA, Pacheco R. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(10):1320-1329.

do Carmo Debur M, Raboni SM, Flizikowski FB, Chong DC, Persicote AP, Nogueira MB, Rosele LV, de Almeida SM, de Noronha L. Immunohistochemical assessment of respiratory viruses in necropsy samples from lethal non-pandemic seasonal respiratory infections. *J Clin Pathol.* 2010; 63(10): 930-934.

Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection—Mexico, March–April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 467–70.

Chae SC, Yoon KH, Chung HT. Identification of novel polymorphisms in the ADAM33 gene. *J. Hum. Genet.* 2003; 48: 278-281.

Chatzopoulou F, Gioula G, Kioumis I, Chatzidimitriou D, Exindari M. Identification of complement-related host genetic risk factors associated with influenza A (H1N1) pdm09 outcome: challenges ahead. *Med Microbiol Immunol.* 2018. doi: 10.1007/s00430-018-0567-9.

Chang J, Braciale TJ. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med.* 2002; 8(1): 54-60.

Cheng OZ, Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol.* 2013; 4 (1):1-13. doi: 10.3389/fimmu.2013.00001.

Chenggang L, Yang P, Yang S, Li T, Wang C, Wang Z, Zou Z, Yiwu Y, Wang W, Wang C, Chen Z, et al. IL17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus. *Cell Research* 2009; 22: 528-538.

Chong DC, Raboni SM, Abujamra KB, Marani DM, Nogueira MB, Tsuchiya LR, Neto HJ, Flizikowski FB, de Noronha L. Respiratory viruses in pediatric necropsies: an immunohistochemical study. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12(3): 211-216.

Chung J, Han T, Kim J, Kim S, Park C, Hwang E. Th1 and Th2 Cytokine levels in nasopharyngeal aspirates from children with human bocavirus bronchiolitis. *J Clin Virol.* 2008; 43(2): 223-225.

Cilloniz C, Martin-Loeches I, Garcia-Vidal C, San Jose A, Torres A. Microbial etiology of pneumonia: epidemiology, diagnosis and resistance patterns. *Int J Mol Sci* 2016; 17: pii E2120. Available from: [http:// www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2120](http://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2120)

Claasen E, Van Bleek G, Rychnavska Z. Identification of a CD4 T cell epitope in the pneumonia virus of mice glycoprotein and characterization of its role in protective immunity. *Virology.* 2007; 368(1): 17-25.

Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, Ross TM, Witztum JL, & Kolls JK. Critical Role of IL-17RA in Immunopathology of Influenza Infection. *J Immunology.* 2009; 183: 5301-5310.

Dominguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A et al Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA* 2009; 302:1880–7. doi: 10.1001/jama.2009.1536.

Duoffre G, Cauchi P, Hendrickx E. Respiratory syncytial virus epidemiology in Belgium in 1998, 1999 and 2000. *J Perinat Med.* 2001; 29(Suppl1, Part 2): 352.

Duncan AL, Leuenroth SJ, Ayala A, Simms HH. CXCL chemokine suppression of polymorphonuclear leukocytes apoptosis and preservation of function is oxidative stress independent. *Shock.* 2000; 13 (3): 244-250.

Estripeaut D, Torres J, Somers C, Tagliabue C. Respiratory syncytial virus persistence in the lungs correlates with airways hyperreactivity in the mouse model. *J Infect Dis.* 2008; 198(10): 1435-1443.

Fujita J, Kawaguchi M, Kokubu F, Ohara G, Ota K, Huang S-K, et al. Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells. *Allergy.* 2012; 67(6): 744–750.

Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med.* 2011; 17(3-4): 293-307. doi: 10.2119/molmed.2010.00138.

Hirose H, Matsuse H, Fukahori S. Effects of repeated respiratory syncytial virus infections on pulmonary dendritic cells in a murine model of allergic asma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008; 147(3): 197-205.

Howard L, Zheng Y, Horrocks M, Maciewicz RA, Blobel C. Catalytic activity of ADAM28. *Febs let.* 2001; 498: 82–86.

Ichikawa A, Kuba K, Morita M, Chida S, Tezuka H, Hara H, Sasaki T, Ohteki T, Ranieri VM, dos Santos CC, Kawaoka Y, Akira S, Luster AD, Lu B, Penninger JM, Uhlig S, Slutsky AS, Imai Y. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187(1): 65-77. doi: 10.1164/rccm.201203-0508OC.

Ito I, Laporte JD, Fiset PO, Asai K, Yamauchi Y, Martin JG, Hamid Q. Downregulation of a disintegrin and metalloproteinase 33 by IFN-gamma in human airway smooth muscle cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119(1): 89-97

Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature.* 2009; 460(7258): 1021-1025.

Jiang X, Wang ZD, Zhu Y, Zhang XI. Inhibition of CD8+ T lymphocytes attenuates respiratory syncytial virus-enhanced allergic inflammation. *Respiration* 2009; 77(1): 76-84.

Kaneko M, Watanabe J, Kuwahara M, Ueno E. Impact of respiratory syncytial virus infections as a cause of lower respiratory tract infections in children younger than 3 years of age in Japan. *J Infect.* 2002; 44(4): 240-243.

Katsurada N, Suzuki M, Aoshima M, Yaegashi M, Ishifuji T, Asoh N, Hamashige N, Abe M, Ariyoshi K, Morimoto K and on behalf of the Adult Pneumonia Study Group-Japan. The impact of virus infections on pneumonia mortality is complex in adults: a prospective multicentre observational study. *BMC Infect Dis.* 2017; 17(755): 2-11. doi: 10.1186/s12879-017-2858-y

Kawagushi M, Adachi M, Oda N, Kokubu M, & Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(6): 1265-1273.

Kim S, Pei Q, Jiang P, Yang M, Qiang X, Lui J. Effect of active vitamin D3 on VEGF-induced ADAM 33 expression and proliferation in human airway smooth muscle cell: implications for asthma treatment. *Respir Res.* 2017; 18 (1): 7-17.

Knott AM, Long CE, Hall CB. Parainfluenza viral infections in pediatrics outpatients: seasonal patterns and clinical characteristics. *Pediatr Infect Dis J.* 1994; 13: 269-273.

Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 2008; 13: 2400-2407.

Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, Cook DJ, Marshall J, Lacroix J et al Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA* 2009; 302:1872–9. doi: 10.1001/jama.2009.1496.

Kurzius-Spencer M, Guerra S, Sherrill DL, Halonen M, Elston RC, Martinez FD. Familial aggregation of allergen-specific sensitization and asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012; 23: 21-27.

Laan M, Palmberg L, Larsson K, & Lidén A. Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways. *Eur Respir J* 2002; 19: 534-537.

Lidén A, Hoshino H, & Laan M. Airway neutrophilia and interleukin-17. *Eur Respir J.* 2000; 15: 973-977.

Louie JK, Acosta M, Winter K, Jean C, Gavali S, Schechter R et al Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. *JAMA* 2009; 302:1896–902. doi: 10.1001/jama.2009.1583.

Martin J & Jo T. Genetic differences in airway smooth muscle function. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5(1): 73-79.

McIntosh K. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med.* 2002; 346(6): 429-437.

Meng L, He X, Zhu W, Yang X, Jiang C, et al. TLR3 and TLR7 Modulate IgE Production in Antigen Induced Pulmonary Inflammation via Influencing IL4 Expression in Immune Organs. *Plos One.* 2011; 6(2): e17252.

Menailo ME, Malashchenko VV, Shmarov VA, Gazatova ND, Melashchenko OB, Goncharov AG, Seledtsova GV, Seledtsov VI. Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2018; 56: 217-221. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.036.

Mochizuki S, Shimoda M, Shiomi T, Fujii Y, Okada Y. ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 315: 79-84.

Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284(4): 566-577.

Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virusinfection. *Mod Pathol*. 2012

Nakatani J, Rocha RT, Holanda MA. Pneumonia adquirida na comunidade (PAC) e no hospital (PAH). In: Prado FC, Ramos J, Valle JR 1º Ed. Atualização Terapêutica. Artes Médicas. 2001; p1256-1263.

Nathan C. Neutrophils and Immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(3): 173-182. doi: 10.1038/nri1785.

Nemeth T, Moscai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2012; 143(1): 9-19. doi: 10.1016/j.imlet.2012.01.013.

Nemeth T, Moscai A. Feedback Amplification of Neutrophil Function. *Trends Immunol*. 2016; 37(6): 412-424. doi: 10.1016/j.it.2016.04.002.

Orth P, Reichert P, Wang W, Prosser WW, Yarosh-Tomasine T, Hammond G, Ingram RN, Xiao L, Mirza UA, Zou J, Strickland C, Taremi SS, Le HV, Madison V. Crystal structure of the catalytic domain of human ADAM33. *J. Mol. Biol*. 2004; 335(1): 129-137.

Parkos CA. Neutrophil-Epithelial Interactions: A Double-Edged Sword. *Am J Pathol*. 2016; 186(6): 1404-1416. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.02.001.

Peiris JS, Hui KP, Yen HL. Host response to influenza virus: protection versus immunopathology. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:475–81. doi: 10.1016/j.coi.2010.06.003.

Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma. *J Pediatr*. 2008; 84(4 Suppl): 68-75.

Shann F. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Pediatr Infect Dis*. 1986; 5(2): 247-252.

Shapiro SD, Owen CA. Adam-33 surfaces as an asthma gene. *N Engl Med*. 2002; 347: 936-938.

Shieh WJ, Blau DM, Denison AM, DeLeon-Carnes M, Adem P, Bhatnagar J, Sumner J, Liu L, Patel M, Batten B, Greer P, Jones T, Smith C, Bartlett J, Montague J, White E, Rollin D, Gao R, Seales C, Jost H, Metcalfe M, Goldsmith CS, Humphrey C, Schmitz A, Drew C, Paddock C, Uyeki TM, Zaki SR. 2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States. *Am J Pathol*. 2010; 177(1): 166-175.

Shrestha SS, Swerdlow DL, Borse RH, Prabhu VS, Finelli L, Atkins CY, Owusu-Eduesei K, Bell B, Mead PS, Biggerstaff M, Brammer L, Davidson H, Jernigan D, Jung MA, Kamimoto LA, Merlin TL, Nowell M, Redd SC, Reed C, Schuchat

A, Meltzer MI. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009-April 2010). *Clin Infect Dis*. 2011; 52 Suppl 1: S75-82.

Shimojo N, Katsuki T, Tateno N, Tomiita M, Kohno Y. T helper lymphocyte response to respiratory syncytial virus and its components in patients with respiratory allergy and nonatopic controls. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147(2): 110-116.

Silva DC, Zavadniak AF, Dias JR, Rosário Filho NA. Asma e atopia em crianças com infecção anterior pelo vírus respiratório sincicial. *J Paranaense Pediatria*; 2: 38-41.

Souza Costa VH Jr, Baurakiades E, Viola Azevedo ML, Traiano G, Kowal Rosales J, Kunze Larsen KS, Raboni SM, de Noronha L. Immunohistochemistry analysis of pulmonary infiltrates in necropsy samples of children with non-pandemic lethal respiratory infections (RSV; ADV; PIV1; PIV2; PIV3; FLU A; FLU B). *J Clin Virol*. 2014; 61(2): 211-215.

Stralioatto SM, Siqueira MM, Muller RI, Fischer GB, Cunha MI, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(4): 283-291.

Tachdjian R, Mathias C, Al Khatib S, Bryce PJ, Kim HS, Blaeser F, O'Connor BD, Rzymkiewicz D, Chen A, Holtzman MJ, Hershey GK, Garn H, Harb H, Renz H, Oettgen HC, Chatila TA. Pathogenicity of a disease-associated human IL-4 receptor allele in experimental asthma. *J. Exp. Med*. 2009; 206 (10): 2191-3204.

Takala AK, Meurman O, Kleemola M, Kela E. Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Pediatr Infect Dis J*. 1993; 12: 189-195.

Tasker L, Lindsay RW, Clarke BT, Cochrane DW, Hou S. Infection of mice with respiratory syncytial virus during neonatal life primes for enhanced antibody and T cell responses on secondary challenge. *Clin Exp Immunol*. 2008; 153(2): 277-288.

Tate MD, Ioannidis LJ, Croker B, Brown LE, Brooks AG, Reading PC. The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice. *PLoS One*. 2011; 6(3): e17618. doi: 10.1371/journal.pone.0017618.

The Global Impact of Respiratory Disease Study 2017. WHO 2018. Interactive versions of this large dataset are available online at:
www.who.int/gard/publications/The_Global_Impact_of_Respiratory_Disease.pdf

Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax*. 2006; 61(7): 611-661.

Rudan I, O'Brien KL, Nair H, Liu, Theodoratou E, Qazi S, Lukšić I, Fischer Walker CL, Black RE, Campbell H; Child Health Epidemiology Reference Group (CHERG). 2013. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative

pathogens for 192 countries. *J Global Health* 3: 010401. <https://doi.org/10.7189/jogh.03.010401>.

Reinhardt RL, Bando JK, Brandon MS, Cheng I. Divergent expression patterns of IL4 and IL13 define unique functions in allergic immunity. *Nat Immunol*. 2012; 13(1): 58-66.

Tumpey MT, Sastre AG, Taubenberger JK, Palese P, et al. Pathogenicity of Influenza Viruses with Genes from the 1918 Pandemic Virus: Functional Roles of Alveolar Macrophages and Neutrophils in Limiting Virus Replication and Mortality in Mice. *J. Virol*. 2005; 79(23): 14933-14944.

UNICEF, Clean the air for children, UNICEF, New York. Disponível em: <https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/>. Acesso em 15 abril 2019.

Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, Mckenny J, Braunschweiger K, et al.: association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*. 2002; 418(6896): 426-430.

Wang JP, Bowen GN, Padden C, Cerny A, Finberg RW, Newburger PE, Kurt-Jones EA. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood*. 2008; 112(5): 2028-2034. doi: 10.1182/blood-2008-01-132860.

Wang EE, Law BJ, Stephens D. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *J Pediatr*. 1995; 126(2): 212-219.

Welte T., Torres A., Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*. 2012; 67: 71–79. doi: 10.1136/thx.2009.129502.

WHO. Pneumonia: The forgotten killer of children. Geneva, The United Nations Children's Fund (UNICEF)/ World Health Organization (WHO), 2006. Available from: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9280640489/en/

Wiehler S, Proud D. Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2007; 293(2): 505-515.

Wong CK, Cao J, Yin YB, Lam CWK. Interleukin-17A activation on bronchial epithelium and basophils: a novel inflammatory mechanism. *Eur Respir J*. 2010; 35(4): 883-893.

Yang Y, Haitchi HM, Cakebread J, Sammut D, Harvey A, Powell RM, Holloway JW, Howarth P, Holgate ST, Davies DE. Epigenetic mechanisms silence a disintegrin and metalloprotease 33 expression in bronchial epithelial cells. *J allergy clin immunol*. 2008; 121(6): 1393-1399 e1-14.

Yoshinaka T, Nishii K, Yamada K, Sawada H, Nishiwaki E, Smith K, Yoshino K, Ishiguro H, Higashiyama S: identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. *Gene*. 2002; 282(1-2): 227-236.

Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, & Kurabayashi M. Relationships between Cytokine Profiles and Signaling Fibroblasts. *Front Microbiol* 2010; 1:124.