

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

ERASMO ASSUMPÇÃO NETO

**BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS SÉRICOS E NASAIS NA
INFECÇÃO PEDIÁTRICA PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.**

SÃO PAULO

2020

ERASMO ASSUMPÇÃO NETO

**BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS SÉRICOS E NASAIS NA
INFECÇÃO PEDIÁTRICA PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.**

Dissertação submetida para Defesa como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientadora: Prof.^a Dr^a Fernanda Marciano Consolim
Colombo**

**SÃO PAULO
2020**

Assumpção Neto, Erasmo.

Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório. / Erasmo Assumpção Neto. 2020.

120 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Profª. Drª. Fernanda Marciano Consolim Colombo.

1. Bronquiolite. 2. Vírus sincicial respiratório. 3. Citocinas. 4. Biomarcadores.

I. Colombo, Fernanda Marciano Consolim. II. Título

CDU 616



São Paulo 07 de dezembro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: ERASMO ASSUMPÇÃO NETO

Título da tese: BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS SÉRICOS E NASAIS NA INFECÇÃO PEDIÁTRICA PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.

Presidente: PROFA. DRA. FERNANDA MARCIANO C. COLOMBO 

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DABONI



Membro: PROFA. DRA. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA



Membro: PROFA. DRA. MARIA CLAUDIA IRIGOYEN



DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família, esposa e filho. A confiança e investimento em mim depositados sempre foram combustíveis para obtenção de meus sonhos e objetivos. Agradeço ao amor, compreensão e peço desculpas pelo tempo pelo qual tive que me abster da companhia de vocês, mas na vida, é necessário dar um passo para trás antes de dar dois para frente. Espero ter muitas caminhadas com vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao reitor Prof. Dr. Eduardo Storópoli, pró-reitora Profa. Dra. Maria Cristina Storópoli e a Universidade Nove de Julho – UNINOVE a qual hoje considero minha segunda casa. Foi ela quem me acolheu e possibilitou minha formação acadêmica em Medicina, me preparando para as provas de residência e o mercado de trabalho. É um prazer levar o nome da instituição e do curso de medicina em todos os hospitais em que trabalho. Foi ela também, que no término da minha especialização em terapia intensiva pediátrica novamente abriu suas portas me aceitando em seu corpo docente e dando a oportunidade de continuar minha formação intelectual com a bolsa de pós-graduação stricto sensu em medicina. Serei eternamente grato. A minha orientadora e diretoria de pós-graduação em Medicina, Profa. Dra. Fernanda Marciano Consolim Colombo que me recebeu de braços abertos e, com muita paciência e compreensão me guiou durante o doutorado.

Agradeço ao meu antigo orientador Prof. Dr. Rodolfo de Paula Viera que me aceitou no laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício – LABPEI, oferecendo todo o subsídio para a realização desse trabalho.

Agradeço a equipe do laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício: Alana, Manoel, Gabriel, Ana Roberta, Jeferson, BreAnne, Evitom, Thomas, Elias, Fabiane, Profa. Dra. Ana Paula, Nicole, Léia, Luana, Adilson e aqueles que mesmo não citados aqui, contribuíram de maneira impar ao meu conhecimento e por estarem sempre ao meu lado nas horas de difíceis, mas principalmente nos bons momentos.

Ao Prof. Dr. Edison Durigon e Profa. Dra. Danielle Bruna do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo – USP, sem vocês a realização do painel viral não seria possível.

A diretoria do curso de Medicina, Profa. Dra. Renata Mahfuz Daud Gallotti, Profa. Dra. Cinthya Cosme Gutierrez Duran e Prof. Msc. Cristiano Gomes além da equipe pediátrica Profa. Dr. Angélica, Dra. Fernanda Hussid e Dra. Marcia Prieto que sempre me apoiaram na concretização desse sonho.

A todos os Prof. Orientadores do programa de Medicina que trabalharam em mim o tripé ensino, pesquisa e extensão.

E por último, porém, mais importante, à Deus por me proteger, dar força, saúde e paciência para completar este objetivo de vida.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O Vírus Sincicial Respiratório (VSR) é um dos principais agentes etiológicos responsáveis pela Bronquiolite, infecção respiratória aguda que causa quadro de sibilância em crianças menores de 2 anos de vida. Estudos pré-clínicos demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas estão correlacionadas com gravidade da doença, recorrência dos sintomas, desenvolvimento de asma, e/ou cronicidade da doença. Poucos estudos avaliaram esse perfil inflamatório na prática clínica.

OBJETIVOS: Analisar biomarcadores de agressão tecidual, citocinas pró e anti-inflamatórias e a ativação de genes de resposta imunológica inata na infecção pediátrica causada pelo VSR.

MÉTODOS: Quantificar em crianças menores de 2 anos de idade, de ambos os sexos, com infecção pelo VSR classificadas clinicamente como leve, e em um grupo controle (neonatos, ambos os sexos), um perfil de biomarcadores e citocinas (ATP; IL1-BETA; IGF1; IL-13; IL-17; IL-23; IL1-RA; RELAXINA 1; IL-10; IL-5; IL-8; RELAXINA 3; VEGF; TSLP) na secreção nasal e sangue, e verificar a ativação gênica da via do NLRP3 e da via P2X7 em leucócitos séricos.

RESULTADOS: O Grupo Bronquiolite, comparado ao grupo Controle, apresentou no aspirado nasal valores menores de ATP, RELAXINA 1, RELAXINA 3, IL-23, IL-13, IL-5 e maiores de IL-8 e IL-1RA. Ainda, nas dosagens séricas, o Grupo Bronquiolite apresentou valores menores de IL-1B e maiores de IL-23. Não houve correção entre a resposta inflamatória nasal e sérica para os diferentes biomarcadores avaliados. Não foi observada diferença estatística entre os grupos na expressão gênica do receptor purinérgico *P2X7R* em leucócitos. Porém, ocorreu menor expressão gênica do NLRP3 nos leucócitos das crianças com Bronquiolite quando comparadas ao controle.

CONCLUSÃO: Em pacientes pediátricos menores de 2 anos de idade, com diagnóstico clínico de bronquiolite leve, a resposta inflamatória parece estar restrita ao território bronco-pulmonar. Podemos inferir que a imunomodulação causada pela maior quantidade de IL1-RA na secreção nasal, pode agir suprimindo as vias Th1, Th2 e Th17 justificando os menores valores de ATP, RELAXINA 1, RELAXINA 3, IL-23, IL-13 e IL-5 na secreção nasal de causada pelo vírus sincicial respiratório. Ainda, a

inibição do inflamossoma NLRP3 em leucócitos poderia favorecer a redução a produção de IL-1 β sistemicamente.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Respiratory Syncytial Virus (RSV) is one of the main etiological agents responsible for Bronchiolitis, an acute respiratory infection that causes wheezing in children under 2 years of age. Pre-clinical studies have shown that pro-inflammatory cytokines, growth factors and chemokines are correlated with disease severity, symptom recurrence, asthma development, and / or chronic disease. Few studies have evaluated this inflammatory profile in clinical practice.

OBJECTIVES: To analyze biomarkers of tissue aggression, pro and anti-inflammatory cytokines and the activation of innate immune response genes in pediatric RSV infection.

METHODS: Quantify in children under 2 years of age, of both sexes, with RSV infection classified clinically as mild, and in a control group (neonates, both sexes), a profile of biomarkers and cytokines (ATP; IL1- BETA; IGF1; IL-13; IL-17; IL-23; IL1-RA; RELAXIN 1; IL-10; IL-5; IL-8; RELAXIN 3; VEGF; TSLP) in nasal secretion and blood, and check gene activation of the NLRP3 pathway and the P2X7 pathway in serum leukocytes.

RESULTS: The Bronchiolitis Group, compared to the Control group, presented lower values of ATP, RELAXIN 1, RELAXIN 3, IL-23, IL-13, IL-5 and higher of IL-8 and IL-1RA in the nasal aspirate. Still, in serum dosages, the Bronchiolitis Group showed lower values of IL-1B and higher values of IL-23. There was no correlation between the nasal and serum inflammatory response for the different biomarkers evaluated. There was no statistical difference between the groups in the expression of purinergic P2X7R receptor in leukocytes. However, less gene expression of NLRP3 occurred in the leukocytes of children with bronchiolitis when compared to the control.

CONCLUSION: In pediatric patients under 2 years of age, with a clinical diagnosis of mild bronchiolitis, the inflammatory response seems to be restricted to the bronchopulmonary territory. We can infer that the immunomodulation caused by the greater amount of IL1-RA in the nasal secretion, can act suppressing the Th1, Th2 and Th17 pathways justifying the lower values of ATP, RELAXIN 1, RELAXIN 3, IL-23, IL-13 and IL-5 in the nasal secretion caused by the respiratory syncytial virus. In addition, the inhibition of NLRP3 inflammasome in leukocytes could favor the reduction of IL-1 β production systemically.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do VSR	6
Figura 2 - Contraste negativo na microscopia eletrônica do VSR	7
Figura 3 - Evolução das internações, custo e óbitos relacionados a Bronquiolite entre 2000 a 2019 no Brasil..	10
Figura 4 - Resposta imunológica inata e adaptativa precoce ao vírus sincicial respiratório (RSV).....	12
Figura 5 - Células imunes envolvidas na resposta ao VSR.....	20
Figura 6 – Gráfico do delta RN pelo número de ciclos do PCR em tempo real.....	32
Figura 7 – Concentração de ATP no aspirado nasal dos grupos Bronquiolite e Controle.....	34
Figura 8 - Comparação da concentração de Relaxina 1 no aspirado nasal.	35
Figura 9 - Comparação da concentração de Relaxina 3 no aspirado nasal.	35
Figura 10 - Comparação da concentração de IL-23 no aspirado nasal.....	36
Figura 11 - Comparação da concentração de IL-13 no aspirado nasal.....	36
Figura 12 - Comparação da concentração de IL-8 no aspirado nasal.....	37
Figura 13 - Comparação da concentração de IL-5 no aspirado nasal.....	37
Figura 14 - Comparação da concentração de IL1-RA no aspirado nasal.....	38
Figura 15 - Comparação da concentração de IL-23 no plasma.	40
Figura 16 - Comparação da concentração de IL1- β no plasma.	41
Figura 17 - Expressão do gene P2X7 em leucócitos séricos	43
Figura 18 - Expressão do gene NLRP3 em leucócitos séricos.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatística Brasileira sobre Bronquiolite	8
Tabela 2. Características clínica e epidemiológicas dos grupos	30
Tabela 3. Média, desvio padrão, valor do p do teste t e poder da amostra nos biomarcadores nasais	33
Tabela 4. Área, intervalo de confiança e valor do p da curva ROC dos biomarcadores nasais.....	34
Tabela 5. Média, desvio padrão, valor do p do teste t e poder da amostra nos biomarcadores séricos	39
Tabela 6. Área, intervalo de confiança e valor do p da curva ROC dos biomarcadores séricos dos grupos.	40
Tabela 7. Correlação entre a quantificação de biomarcadores nasais e séricos do Grupo Bronquiolite.	42

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ALAT	Associação latino-americana de tórax
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato.
CCL	Ligante de quimiocina com domínios C-C (do inglês: Chemokine (C-C motif) ligand)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês: complementary desoxiribonucleic acid)
Ct	Limiar do ciclo (do inglês: cycle threshold)
CXCL	Quimiocina com domínios C-X-C (do inglês: chemokine (C-X-C motif))
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano (do inglês: Damage-associated molecular patterns)
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
EGF	Fator de crescimento epitelial (do inglês: epithelial growth factor)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos.
Flu	Influenza vírus A e B.
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (do inglês: granulocyte-colony stimulating factor)
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (do inglês: granulocyte-macrophage colony-stimulating fator)
GRO α	(do inglês: Growth-regulated oncogene-alpha) também conhecido por CXCL1
HAdV	Adenovírus humano.
HBoV	Bocavírus humano.

HCoV	Coronavírus tipo OC43, HKU1, NL63, 229E.
HEV	Enterovírus humano.
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês: hepatocyte growth factor)
HRV	Rinovírus humano.
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon gama.
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (do inglês: insulin-like growth factor)
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina 10.
IL-13	Interleucina 13.
IL-15	Interleucina 15.
IL-17	Interleucina 17.
IL-18	Interleucina 18.
IL1-RA	Antagonista do receptor da interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta.
IL-2	Interleucina 2.
IL-23	Interleucina 23.
IL-4	Interleucina 4.
IL-5	Interleucina 5.
IL-6	Interleucina 6.
IL-7	Interleucina 7.
IL-8	Interleucina 8.
IL-9	Interleucina 9.
IP-10	Interferon gama induzido pela proteína 10.
I-TAC	Interferon de quimioatração de células T.
Log	Logarítmico
MCP	Proteína quimioatraente de macrófagos e monócitos
MCP-1	Proteína de quimioatração de monócitos 1
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófago
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófago 1-beta.
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago 1-alfa.

MPV	Metapneumovírus humano
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NLR	Receptores semelhantes a NOD (do inglês: NOD-like receptors)
NOD	Domínios de oligomerização de ligação de nucleótidos (do inglês: Nucleotide-binding and oligomerization domain)
NRLP	(do inglês: Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
P2XR	Receptores P2 purinérgicos
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: Pathogen-associated molecular pattern)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Reação em cadeia de polimerase.
PCR-RT	PCR em tempo real
PIV	Parainfluenza vírus 1, 2, 3 e 4.
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
qPCR	PCR quantitativo
RANTES	(do inglês: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) também conhecida por CCL5
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: ribonucleic acid)
ROC	Característica de Operação do Receptor (do inglês: Receiver Operating Characteristic)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês: reactive oxygen species)
SBP	Sociedade Brasileira de Pediatria
Th	T auxiliar (do inglês: T helper)
Th1	Linfócito T helper, via de sinalização 1.
Th17	Linfócito T helper, via de sinalização 17.
Th2	Linfócito T helper, via de sinalização 2.
TLR	Receptor tipo Toll (do inglês: toll-like receptors)
TLR2	Toll-like receptor número 2.
TLR3	Toll-like receptor número 3.
TLR4	Toll-like receptor número 4.

TLR7	Toll-like receptor número 7.
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa.
Treg	Linfócito T regulador
TSLP	Linfopoietina estromal tímica (do inglês: Thymic stromal lymphopoietin)
UDP	Uridina difosfato
USP	Universidade de São Paulo
UTP	Uridina trifosfato
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês: vascular endothelial growth factor)
VPN	Valor preditivo negativo.
VPP	Valor preditivo positivo.
VSR	Vírus Sincicial Respiratório.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	INSUFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA NA PEDIATRIA	1
1.2	INFECÇÃO DAS VIAS AÉREAS NA PEDIATRIA	3
1.3	BRONQUIOLITE	4
1.4	BIOMARCADORES IMUNOPATOLOGICOS RELACIONADOS A BRONQUIOLITE.....	18
2	OBJETIVOS GERAL	22
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
3.1	CASUÍSTICA.....	24
3.2	MÉTODOS	25
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS GRUPOS	29
4.2	BIOMARCADORES NASAIS.	33
4.3	BIOMARCADORES SÉRICOS.	39
4.4	CORRELAÇÃO DOS BIOMARCADORES SÉRICOS E NASAIS NOS PACIENTES COM BRONQUIOLITE	42
4.5	EXPRESSÃO GÊNICA DO P2X7 PURINÉRGICO	43
4.6	EXPRESSÃO GÊNICA DO NLRP3 INFLAMASSOMA	44
5	DISCUSSÃO	46
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7	GLOSSÁRIO	57
8	ANEXOS	62
8.1	ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UNINOVE	62
8.2	ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do Conjunto Hospitalar do Mandaqui	64
8.3	ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	66
8.4	ANEXO 4 – Folha de escores	68
8.5	ANEXO 5 – Protocolo laboratorial	69

8.6	ANEXO 6 – Carta de autorização da Instituição co-participante	70
8.7	ANEXO 7 – ARTIGO PUBLICADO	71
8.8	ANEXO 8 – ACEITE DO TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO NO FORMATO DE PÔSTER NO 10º CONGRESSO DA ALAT.	101
8.9	ANEXO 9 - ACEITE DO TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO ORAL NO 10º CONGRESSO DA ALAT.....	102
8.10	ANEXO 10 – PRÊMIO DADO AOS 50 MELHORES TRABALHOS DO 10º CONGRESSO DA ALAT.....	103
8.11	ANEXO 11 – ACEITE DO TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO NO FORMATO DE PÔSTER NO ERS INTERNATIONAL CONGRESS 2016 – LONDON 104	
8.12	ANEXO 12 – ARTIGO PUBLICADO	105
8.13	ANEXO 13 – ACEITE DO TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO NO FORMATO DE PÔSTER NA EB 2019.	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 INSUFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA NA PEDIATRIA

As síndromes patológicas do aparelho respiratório são a causa mais comum de atendimento nos prontos-socorros infantis e nas salas de emergência hospitalares do mundo e, sua evolução para insuficiência respiratória é a principal causa de parada cardiorrespiratória na faixa etária pediátrica. A insuficiência respiratória aguda é definida como a insuficiência do sistema respiratório de difundir quantidade suficiente de oxigênio para suprir as demandas teciduais e de eliminar o dióxido de carbono proveniente do metabolismo celular. (KLIEGMAN, 2016; PIVA, 1998)

A insuficiência respiratória aguda na pediatria apresenta como sinais e sintomas o aumento da frequência respiratória (taquipnéia), dificuldade em respirar (dispneia) e o aumento do trabalho respiratório evidenciado pela utilização da musculatura acessória da respiração e pelo aparecimento de movimentação paradoxal do abdome, tiragem subdiafragmática, intercostal, de fúrcula e batimento das aletas nasais. (MATSUNO, 2012)

A dispneia, ou dificuldade para respirar pode ser causada por anormalidades na quantidade de gases respiratórios nos líquidos corporais, como a hipóxia ou hipercapnia, aumento do trabalho respiratório e consequente maior utilização dos músculos respiratórios e até alterações do estado mental. (HALL, 2017)

As crianças têm particularidades fisiológicas e anatômicas que auxiliam no desenvolvimento da insuficiência respiratória aguda frente as patologias do sistema respiratório. Em comparação aos adultos, as crianças têm a língua maior, mandíbula menor, menor quantidade de alvéolos, menor quantidade de vias de ventilação colateral, menor diâmetro das vias aéreas (reflete em um aumento da resistência do fluxo de ar), maior complacência pulmonar e de caixa torácica, maior risco de fadiga respiratória devido à musculatura respiratória ser menos desenvolvida e, dependendo de sua faixa etária, menor quantidade de surfactante. (HALL, 2017; PIVA, 1998; PALS, 2010)

O excesso de secreção produzida nas patologias pulmonares pediátricas gera o bloqueio das vias aéreas que levam o ar para os alvéolos pulmonares resultando no aumento da tensão superficial alveolar independente da ação do surfactante pulmonar tendendo ao colapso. Dessa forma, a mecânica pulmonar se encontra comprometida pelo aumento de aproximadamente 4,5 vezes da pressão alveolar. (HALL, 2017)

Sendo assim, a pressão gerada como resultado da tensão superficial alveolar é inversamente proporcional ao raio do alvéolo. Podemos então concluir que quanto menor o alvéolo pulmonar, maior será sua pressão alveolar decorrente de sua tensão superficial. Essa análise é fundamental para o entendimento da insuficiência respiratória na pediatria. (HALL, 2017)

Analisando em conjunto todos os tópicos abordados, as crianças apresentam características únicas que lhe conferem maior risco de evolução para insuficiência respiratória.

1.2 INFECÇÃO DAS VIAS AÉREAS NA PEDIATRIA

A maioria das infecções pediátricas são decorrentes ao comprometimento do trato respiratório. Crianças menores de 2 anos que frequentam creche são as mais afetadas podendo ter o risco de 2-3 vezes maior de desenvolver otite média aguda. (KLIEGMAN, 2016) O vírus são os principais agentes e a infecção viral das vias aéreas superiores é a doença mais comum nos seres humanos, sendo responsável entre 7 a 10 episódios ao ano em crianças na idade escolar. Sua principal apresentação clínica, o resfriado comum, pode evoluir para otite média aguda, faringoamigdalite e até rinossinusite.

A Infecção aguda das vias aéreas inferiores é um processo inflamatório agudo que acomete os brônquios, bronquíolos, alvéolos e espaço intersticial podendo ou não ter etiologia infecciosa. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), aproximadamente 40 a 60% de todos os atendimentos pediátricos na América Latina são decorrentes de infecções respiratórias agudas. (SALOMÃO JUNIOR, 2011; SBP 2017)

No ano de 2010, as doenças infecciosas foram responsáveis por 58% das mortes de crianças menores de 5 anos no mundo, sendo que na América Latina as infecções respiratórias foram responsáveis por mais 80.000 mortes anuais, sendo 40% delas no Brasil (MARTINS, 2016)

1.3 BRONQUIOLITE

A Bronquiolite é uma patologia pediátrica que acomete principalmente o sistema respiratório inferior (brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares). Toda criança com menos de 2 anos de idade que apresente o primeiro episódio de sibilância cumpre o principal critério da doença e é diagnosticada como Bronquiolite. Os vírus são os principais causadores da Bronquiolite, destacando-se o vírus sincicial respiratório (VSR), responsável por 50-75% de todas as infecções sendo o principal agente etiológico. (KLIEGMAN, 2016; SBP, 2017) O VSR é responsável pela hospitalização de aproximadamente 110 mil crianças menores de 1 ano de idade nos Estados Unidos (KLIEGMAN, 2016). A taxa de mortalidade em crianças saudáveis varia em torno de 0,5 - 1% ao ano (RICCETO, 2006, PERALES, 2016) enquanto em países subdesenvolvidos pode chegar até 7% (PERALES, 2016)

A Bronquiolite é mais comum em crianças do sexo masculino que não foram amamentados e vivem em ambientes superpopulosos. Em lactentes de mães jovens e tabagistas o risco é ainda maior. (KLIEGMAN, 2016). Lactentes menores de seis meses, prematuros, cardiopatas e portadores de doença pulmonar crônica da prematuridade são o grupo de maior risco para o desenvolvimento de quadros graves, sendo necessária internação em aproximadamente 12% dos casos. (SBP, 2017; PERALES, 2016)

Ao tossir ou espirrar, os familiares ou outras crianças doentes disseminam secreções respiratórias infectadas com o vírus no ambiente. As crianças adquirem a doença quando entram em contato direto com as secreções ou a fômites infectados (objetos inanimados que são capazes de absorver, reter e transportar organismos contagiantes entre indivíduos, por exemplo as mãos, maçaneta, etc.) constituindo assim, o principal meio de transmissão da doença, classificando-a como extremamente contagiosa. (KLIEGMAN, 2016)

Sua principal característica fisiopatológica é a inflamação do trato respiratório, edema dos bronquíolos e aumento da secreção que obstruem as vias aéreas aumentando assim a resistência a passagem do fluxo de ar. (KLIEGMAN, 2016). Após a infecção das vias aéreas superiores, o VSR invade a via aérea inferior acometendo principalmente bronquíolos de 75-300 µm de diâmetro se multiplicando rapidamente

sendo que após 24 horas já ocasiona necrose e edema do epitélio respiratório, tampões de muco, detritos celulares e destruição das células ciliadas. A redução ou obstrução da luz do bronquíolo terminal funciona como mecanismo valvular gerando aprisionamento de ar, enfisema e atelectasias alterando assim a relação ventilação/perfusão do paciente. (PERALES, 2016)

Clinicamente, a Bronquiolite se assemelha ao resfriado comum podendo apresentar tosse seca e coriza hialina. O quadro clínico evolui em gravidade até que atinge seu pico no 4º dia de doença apresentando febre baixa, irritabilidade, sibilância, taquipnéia (aumento da frequência respiratória) e dispneia (desconforto respiratório) evidenciado pela utilização da musculatura acessória na respiração. (KLIEGMAN, 2016; PERALES, 2016)

O diagnóstico da doença é feito de maneira clínica e a pesquisa do VSR nas secreções nasofaríngeas pode ser realizado em todas as crianças com suspeita clínica, principalmente nas internadas em hospitais. O teste rápido via imunofluorescência direta e indireta apresenta positividade de 69% a 90% e a pesquisa via PCR apresenta maior sensibilidade, podendo assim pesquisar até coinfeção com outros vírus. Ambas as coletas devem ser realizadas até o início do 5º dia dos sintomas. (PERALES, 2016)

O tratamento da doença consiste em terapias de suporte. A hidratação é fundamental pois o paciente perde muito líquido decorrente da taquipnéia e não se alimenta corretamente devido a dispneia. Decorrente ao acúmulo de dióxido de carbono e dificuldade na difusão dos gases alveolares, a utilização de oxigênio suplementar é necessária na maioria dos casos podendo ser necessária assistência ventilatória em casos de insuficiência respiratória. (KLIEGMAN, 2016).

Nos anos 60, a administração de vacina com formol contra VSR (VSRIF) resultou em 80% de hospitalização devido a uma forma avançada de doença. Duas crianças morreram e dezoito desenvolveram bronquiolite e / ou pneumonia, caracterizada por grande quantidade de monócitos e eosinófilos em os pulmões. Altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, células auxiliares TH2, IL-4, IL-13 e IL-15 também foram detectados em camundongos vacinados com VSRIF. Este episódio dramático destaca a necessidade de melhorar os conhecimentos sobre as respostas imunológicas infantis frente à infecção viral, bem como à patogênese do RSV em recém-nascidos. (DRAJAC, 2017)

VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

O Vírus Sincicial Respiratório (VSR) (Figura 01) é um RNA vírus da família Paramyxoviridae, envelopado, não segmentado de tamanho médio (120 a 300 nm). O envelope viral possui uma camada bilipídica. Sua superfície contém glicoproteínas de superfície transmembrana de 11 a 12 nm de comprimento e 6 a 10 nm de distância, que na microscopia eletrônica (Figura 02) conferem-lhe uma aparência semelhante a um cardo (plantas do gên. *Carduus*, da fam. das compostas, nativas da Europa, da Ásia, do Mediterrâneo e das regiões montanhosas do Leste da África.) (WALSH,2017; DRAJAC,2017)

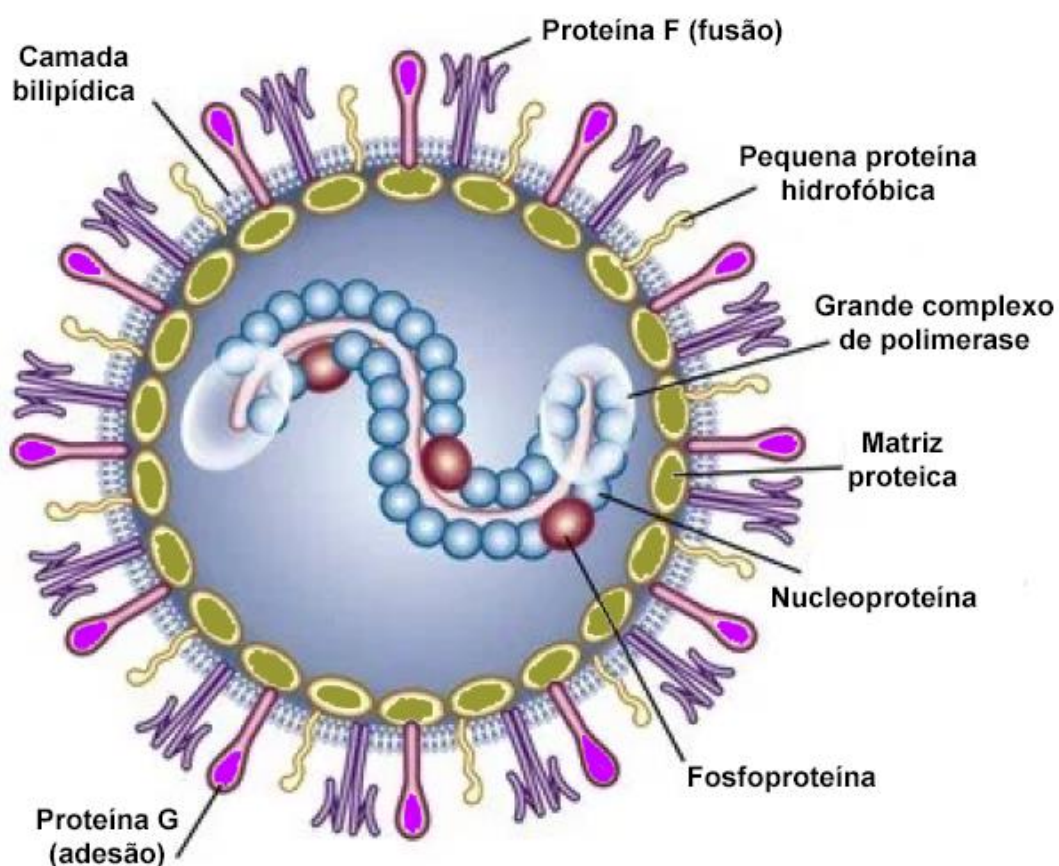


Figura 1 - Estrutura do VSR (adaptado de Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. N Engl J Med 2001, 344:1917-1928)

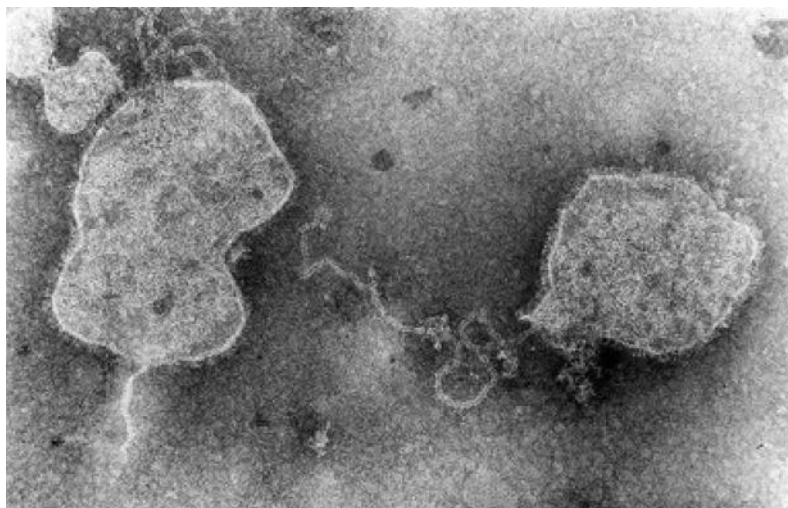


Figura 2 - Contraste negativo na microscopia eletrônica do VSR. (www.oncohemakey.com.br)

Ele foi descoberto por Morris Blount e Savage em 1955 durante uma epidemia de “macacos adolescentes” com coriza grave. Sua estrutura é constituída pela proteína G, responsável pela aderência do vírus na célula hospedeira e a proteína F responsável pela penetração celular do vírus no hospedeiro e formação de sincícios. Ambas as proteínas produzem anticorpos neutralizantes no paciente hospedeiro, presentes em mais de 99% das crianças com 4 anos de idade (PERALES, 2016). As duas principais proteínas de superfície, F e G, são os principais antígenos imunoprotetores e são os alvos para a neutralização mediada por anticorpos do hospedeiro. (WALSH,2017; DRAJAC,2017)

O RNA viral do VSR contém 15.222 nucleotídeos e 10 genes. Cada gene codifica uma única proteína, exceto o gene M2 que codifica duas proteínas separadas (M2-1 = fator de processabilidade da transcrição e M2-2 = proteína reguladora da transcrição). O complexo de nucleocapsídeo contendo RNA é composto por quatro proteínas - N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), L (polimerase) e M2-1. A NS1 e NS2, são proteínas não estruturais que inibem a atividade do interferon tipo I afetando diretamente a resposta imune adaptativa ao RSV. (WALSH,2017)

O VSR é um dos principais agentes etiológicos responsáveis pela infecção respiratória aguda em crianças até os 2 anos de vida. (LOTZ, 2012; SBP, 2017, TORTORA, 2012). Seu período de incubação gira em torno de 2 a 8 dias. (SBP, 2017)

O vírus sincicial respiratório pode ocasionar dois tipos de lesão pulmonar histopatológicas. Uma de padrão bronquiolar onde os bronquíolos ficam preenchidos

por muco, descamação epitelial e presença de detritos inflamatórios e outra de padrão alveolar distal, quando os alvéolos ficam preenchidos por detritos celulares e células do sistema imune. (BRASILEIRO-FILHO, 2016; PERALES, 2016)

O nome do vírus é baseado em sua característica de causar fusão celular gerando assim uma estrutura celular chamada de sincício (célula gigante multinucleada resultante de infecção viral) quando cultivado laboratorialmente em cultura de células. (TORTORA, 2012).

Segundo a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), as infecções pelo VSR ocorrem em regiões de clima temperado e subtropical (equatorial), principalmente no outono e inverno em estações que duram de 16 a 20 semanas. No Brasil os dados oficiais do sistema de vigilância epidemiológica mostram que o pico de circulação do VSR ocorre entre os meses de janeiro a junho (SBP, 2017)

A infecção pelo VSR na infância está correlacionada com um grande risco do desenvolvimento e/ou exacerbações da ASMA em pacientes de diferentes faixas etárias e na vida adulta (LOTZ, 2012)

EPIDEMIOLOGIA

Segundo a OMS, o VSR é responsável mundialmente por 60 milhões de infecções, destas, 160 mil mortes por ano. Nos Estados Unidos da América (EUA) ocorrem aproximadamente 55 a 125 mil internações e entre 250 a 500 mortes por ano (HALL, 2017; SHAY, 1999), número esse maior em comparação a estatística Brasileira (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística Brasileira sobre Bronquiolite

<i>Análise/ Ano</i>	<i>Internações</i>	<i>Valor (R\$)</i>	<i>Dias de permanência</i>	<i>Média de permanência</i>	<i>Taxa de mortalidade</i>	<i>Óbitos</i>
2000	49.800	8.248.611,36	186.925	3,8	0,46	231
2001	49.486	8.060.024,89	184.444	3,7	0,37	182
2002	31.982	5.180.556,73	130.288	4,1	0,32	103
2003	26.382	4.560.415,76	108.723	4,1	0,28	74
2004	28.340	5.840.424,56	116.409	4,1	0,25	71
2005	28.167	6.063.746,27	116.158	4,1	0,22	61

2006	29.377	6.265.419,46	123.373	4,2	0,24	70
2007	34.127	7.653.893,36	142.943	4,2	0,22	76
2008	39.509	11.012.372,53	172.306	4,4	0,63	250
2009	46.785	13.924.858,15	193.312	4,1	0,62	290
2010	47.951	14.993.942,96	195.173	4,1	0,60	290
2011	54.368	18.009.689,53	226.960	4,2	0,61	330
2012	54.115	18.336.319,66	224.675	4,2	0,57	308
2013	57.284	18.886.312,83	240.484	4,2	0,67	383
2014	51.522	18.267.454,43	218.259	4,2	0,59	302
2015	55.760	20.984.946,10	236.165	4,2	0,65	362
2016	53.315	20.288.025,58	228.099	4,3	0,58	309
2017	61.555	24.746.674,61	261.910	4,3	0,59	361
2018	65.682	28.242.209,99	283.302	4,3	0,63	417
2019	67.634	30.529.739,93	293.185	4,3	0,59	396

Fonte: Ministério da Saúde do Brasil.

Os dados Brasileiros demostram que as internações, valor gasto e dias de permanência se comportam de maneira diretamente proporcionais, porém, não observamos diferença na média de permanência já que a história natural da doença e sua evolução são as mesmas. A taxa de mortalidade e óbitos não apresentaram mudança nos últimos anos pois não ocorreu nenhuma nova descoberta no método de tratamento da doença, feita apenas com a utilização de sintomáticos.

Evolução das internações, custo e óbitos da Bronquiolite no Brasil

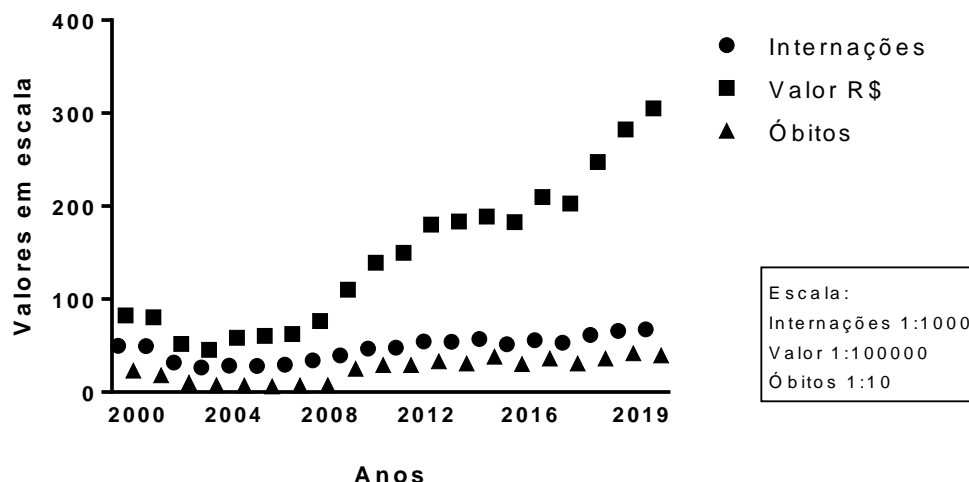


Figura 3 - Evolução das internações, custo e óbitos relacionados a Bronquiolite entre 2000 a 2019 no Brasil. Fonte: Ministério da Saúde do Brasil.

Baseado na figura 3, podemos observar visualmente que a partir de 2003 ocorreu aumento no número de internações refletindo diretamente no aumento dos gastos relacionados ao tratamento da doença, mantendo-se estável a taxa de mortalidade.

SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico está presente no organismo com a função de proteger e gerar respostas contra infecções por microrganismos (vírus, bactérias e fungos) e células neoplásicas, diferenciando o próprio do não próprio. Para melhor compreensão da resposta imunológica, a resposta imune pode ser dividida em resposta imune inata e resposta imune adaptativa. A resposta imune inata tem como objetivo eliminar qualquer tipo de ameaça que apresente padrões de reconhecimento molecular, mantendo assim a homeostase e o correto funcionamento do organismo. É composta por proteínas, citocinas e células fagocitárias encontradas no sangue e nas barreiras naturais de proteção do corpo humano como na pele e seus anexos (ABBAS, 2012).

Quando resposta imune inata é insuficiente e ocorre a quebra da homeostase, a resposta imune adaptativa torna-se importante e ativa. A resposta imune adaptativa é

formada por células (linfócitos T e linfócitos B) e proteínas específicas com o objetivo de montar um repertório de memória para quando o organismo entre em contato com algum patógeno em uma segunda oportunidade, que a resposta seja mais rápida e eficiente (ABBAS, 2012).

Várias hipóteses e teorias tentam explicar como o sistema imune age contra o VSR. Estudos *in vitro* e em modelos animais são os principais fornecedores de conhecimento imune, porém, em humanos a resposta imune não pode ser separada de fatores como o ambiente, idade, genética e experiência antigênica do paciente

A importância da resposta imune do paciente para o desenvolvimento da doença e complicações a longo prazo é baseada na observação que o VSR não é invasivo ou citopatogênico. Embora as cargas virais estejam correlacionadas a gravidade da doença, a administração de anticorpos neutralizantes para a proteína F objetivando a redução da replicação viral não demonstrou melhora da doença em bebês. (WALSH,2017)

RESPOSTA IMUNE INATA

A resposta imune inata é primeira linha de defesa do organismo e ocorre frente a diferentes estímulos, lesões, danos celulares, ação direta de microorganismos, ou inflamações (AKIRA, 2006; BEUTLER, 2006; WALSH,2017). É desenvolvida a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) gerados de estresse endógeno causados pelo patógeno. O reconhecimento de PAMPs e DAMPs ocorre por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células do sistema imune como monócitos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas dentre outras. A ativação dos PRRs desencadeia cascatas de sinalização que levam à produção de interferons (IFNs) do tipo I (IFN- α e β) e citocinas pró-inflamatórias (ABBAS, 2012).

As proteínas NS1 e NS2 produzidas pelo VSR inibem os interferons antivirais celulares do tipo I (α , β e λ). Além disso, o VSR interage com o receptor de membrana Toll-like (TLR) 2, 3, 4 e 7 desencadeando a secreção de citocinas pró-inflamatórias. (WALSH,2017)

Após o VSR infectar o epitélio respiratório do hospedeiro, macrófagos e células apresentadoras de antígenos produzem marcadores de superfície celular, liberando

citocinas (Figura 04) e recrutando neutrófilos, bem como macrófagos, células mononucleares, células T, células assassinas naturais (NK) e eosinófilos para o trato respiratório. Bebês intubados com infecção primária grave por VSR apresentam infiltração neutrofílica das vias aéreas, correlacionada diretamente ao declínio na carga viral frente ao desenvolvimento das respostas de linfócitos T. A variabilidade na defesa inata e a suscetibilidade do hospedeiro estão sendo correlacionadas com polimorfismos genéticos que são essenciais para vários componentes da imunidade inata. (WALSH,2017)

A proteína G do VSR liga-se às células do trato respiratório e a proteína F interage com as células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas) através da proteína do receptor Toll-like 4 (TLR4). Isso desencadeia a produção e liberação de IFN- α , IFN- β , IFN- γ e uma cascata de citocinas pró-inflamatórias. O NS1 e NS2 antagonizam a produção de interferon. As citocinas recrutam células polimorfonucleares, células NK e células TCD4 e TCD8. A resposta celular do tipo Th1 torna-se predominante sob a influência de IFN- γ e interleucina-12, enquanto a produção de IL-4 e IL-13 muda a resposta para direção Th2, com a produção de imunoglobulina E (IgE) e eosinófilos. (WALSH,2017)

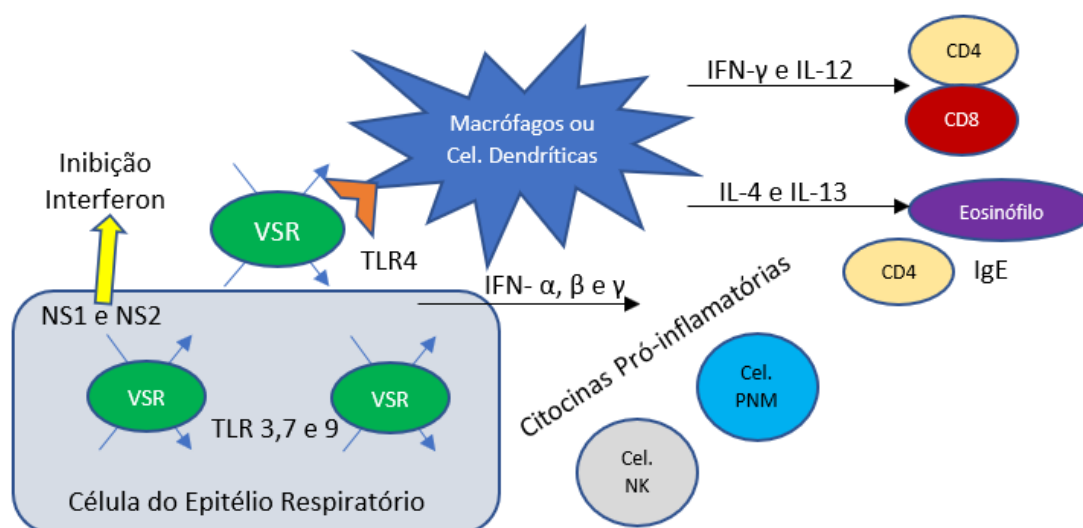


Figura 4 - Resposta imunológica inata e adaptativa precoce ao vírus sincicial respiratório (RSV).

(Adaptado de Hall CB, Walsh EE. Respiratory syncytial virus. In: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S, eds. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2009:2462-2487.)

Outro sinal de inflamação que atua como importante mediador dessa resposta é a adenosina trifosfato (ATP), implicada como mediadora de "sinal de perigo" na inflamação aguda e crônica, que pode ser liberada em grandes quantidades a partir de vários tipos de células após estresse celular ou lesão tecidual. O trifosfato de adenosina (ATP) está presente fisiologicamente em baixos níveis no meio extracelular, porém em estados de stress ou morte celular o mesmo é liberado massivamente sendo responsável por modular um sistema de sinalização evoluído denominada sinalização purinérgica que está envolvida várias situações patológicas inflamatórias. (MULLER, 2011) Assim, o ATP extracelular e outros nucleotídeos (por exemplo, ADP, UTP e UDP) exercem seus efeitos por meio da ligação aos receptores P2 purinérgicos (P2XR). (MULLER, 2011; SAVIO, 2018)

Entre os subtipos de P2XR, o P2X7R é particularmente expresso em células do sistema imune inato e seu comportamento é único após exposição repetitiva ou prolongada a altas concentrações de ATP. A ativação do P2X7R em células imunes, incluindo células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, está envolvida em diversas respostas celulares pró-inflamatórias, como a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), metaloproteinase de matriz-9 e citocinas (IL-2, IL-6 e IL-18). O P2X7R também é envolvido na via NALP3 inflamassoma com relação à produção e liberação de IL-1 β , a qual tem demonstrado desempenhar um papel importante em doenças como a asma (MULLER, 2011). O receptor P2X7 está envolvido na ativação de caspases, indução de apoptose, em várias condições patológicas inflamatórias, modulando a resposta imune adaptativa e o equilíbrio entre a geração de linfócitos T helper tipo 17 (Th17) e T reguladores (Treg). (SAVIO, 2018)

Os inflamassomas são complexos multiproteico formados no citoplasma de fagócitos mononucleares, células dendríticas e outros tipos de células que fazem parte do sistema imune inato de reconhecimento de patógenos (GUO, 2015) que modulam a maturação das caspases pró-inflamatórias levando a ativação de citocinas pró-inflamatórias (SINGHAL, 2014). Vários são os inflamassomas já descritos como NLRP 1, NLRP3, NAIP, NLRC 4 e AIM2. (RATHINAM, 2016)

A ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos precisa obrigatoriamente de das etapas de preparação e ativação. A etapa de preparação (sinal 1) ocorre por estímulos inflamatórios, como por exemplo os agonistas de TLR4 que induzem a expressão de NLRP3 e pró-IL-1 β mediada por NF- κ B, e a etapa de ativação (sinal 2)

que é desencadeada por PAMPs e DAMPs, promovendo assim o NLRP3 para a montagem do inflamassoma e secreção de IL-1 β e IL-18 mediada pela caspase-1 e piroptose. (YANG, 2019)

A ativação de um inflamossoma (ativação canônica) necessita de um primeiro gatilho mediado por receptores de citocinas pró-inflamatórias ou via TLRs que agem na formação de NLR, principalmente a isoforma NLRP3 (receptor do tipo NOD com domínio pirina 3). O segundo gatilho ocorre via sensibilização dos DAMPs induzindo a formação dos inflamassomas compostos pelo NLRP3, pro-caspase 1 e a proteína adaptadora ASC (proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD) que contém um domínio de recrutamento e ativação da caspase (SINGHAL, 2014; BARBÉ, 2014; LECHTENBERG, 2014; MARTINON, 2002)

A caspase-1 ativa, cliva as formas inativas das citocinas da família pró-inflamatórias IL-1 gerando suas formas bioativas IL-1 β e IL-18, as quais podem causar piroptose (tipo de morte celular inflamatória). (GUO, 2015; RATHINAM, 2016)

Na família dos inflamassomas, o NLRP3 possui papel importante no controle de infecções virais promovendo a produção das citocinas pró-inflamatórias de IL-1 β e IL-18. Os mecanismos de ativação do NLRP3 descritos pela maioria dos estudos incluem o efluxo de potássio intracelular, aumento de cálcio intracelular, a geração de ROS mitocondrial, translocação de NLRP3 para a mitocôndria, liberação de DNA mitocondrial ou cardiolipina e a liberação de catepsinas no citosol após a desestabilização lisossomal. (GUO, 2015).

Nem todos esses eventos são induzidos por todos os agonistas do NLRP3, cujo mecanismo de ativação ainda é discutido. Embora muitos estudos apoiem o envolvimento de catepsinas lisossômicas (proteases que degradam proteínas internalizadas) na ativação do NLRP3, é importante notar que isso não é consenso. Na maioria dos tipos celulares, o NLRP3 pode ser inicialmente ativado por meio da ligação do lipopolissacarídeo (LPS) ao receptor tipo *Toll* (TLR). Sabe-se que a sinalização da cascata intracelular que culmina na ativação de NF- κ B leva ao aumento da expressão de NLRP3. (GUO, 2015).

Atualmente, o ATP (adenosina trifosfato), as toxinas formadoras de poros, substâncias cristalinas, os ácidos nucleicos, ácido hialurônico e patógenos fúngicos, bacterianos e virais são utilizados como agonistas de NLRP3 e que induzem a sua

formação. Esses estímulos podem ser encontrados durante a infecção, produzidos por patógenos ou liberados por células hospedeiras danificadas (GUO, 2015).

Estudos *in vitro* utilizando cultura celular de epitélio pulmonar descreveram a produção de IL-1 β mediada a ativação do inflamassoma NLRP3 secundário a infecção pelo VSR. Neste caso, o VSR tem o diferencial de conseguir desencadear os dois gatilhos do inflamassoma. Inicialmente com a ativação via TLR2 em camundongos e TLR4 em humanos secundariamente com a produção de uma proteína de membrana chamada viroporina SH que modula o efluxo de potássio intracelular (TRANTAFILOU, 2012; SEGOVIA, 2012)

Mesmo com a escassa literatura, sugere-se que a infecção pelo vírus sincicial respiratório gera a ativação do inflamassomas NLRP3 em células do epitélio pulmonar. No entanto, nenhum estudo até a presente data investigou se a mesma ativação ocorre em leucócitos séricos, muito menos em pacientes *in vivo*. Esse é o principal objetivo do presente estudo.

RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

A resposta imune adaptativa é mediada pelos linfócitos T e B e consiste no modo específico do organismo combater e eliminar as infecções e as células neoplásicas (ABBAS, 2012). As características desse tipo de resposta envolvem a expansão clonal e memória celular, caso o organismo tenha entrado em contato mais de uma vez com o epítipo do antígeno (ABBAS, 2012).

As células da resposta imune adaptativa são compostas pelos linfócitos T e B e apresentam características e funções diferentes. Os linfócitos T podem ser divididos em duas principais subpopulações, os linfócitos TCD4+ e TCD8+, cuja ativação requer uma célula apresentadora de antígenos (APC) para que sejam desencadeados 2 principais sinais de ativação: o 1º sinal é composto pela ligação da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I ou II (associada a um peptídeo) ao receptor de linfócito T (TCR) e o 2º sinal composto pela ligação das moléculas coestimuladoras à molécula CD28 dos linfócitos T (ABBAS, 2012).

Os linfócitos TCD4+ são conhecidos como linfócitos T auxiliares (Th, do inglês *T helper*), que podem gerar uma diversidade de respostas que são determinadas de acordo com o perfil de citocinas secretadas por estes linfócitos após serem ativados.

Deste modo são gerados subtipos de linfócitos TCD4+, que incluem Th1, Th2, Th17 e Treg.

Os linfócitos Th1 são induzidos quando na presença da citocina IL-12 e são caracterizados pela produção de diferentes citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN- γ (citocina que auxilia na ativação de linfócitos T citotóxicos, macrófagos e células natural killer (NK) para a eliminação de patógenos intracelulares), TNF, IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12, IL-16 e IL-18. Os linfócitos Th2 têm como perfil de resposta a secreção de citocinas que atuam em outras células imunes e outras com perfil tipicamente anti-inflamatório, como IL-4 (induz respostas do anticorpo IgE), IL-5 (ativa eosinófilos), IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Os linfócitos Th17, por sua vez, secretam citocinas como IL-17, IL-22 e IL-23 que recrutam leucócitos, principalmente neutrófilos, para os sítios de infecção. A principal função das células Th17 inclui induzir a inflamação neutrofílica (resposta pró-inflamatória) com consequente destruição de microrganismos extracelulares e a produção de defensinas (ABBAS, 2012). Os linfócitos Treg (reguladores) são caracterizados pela presença de receptores específicos (FOXP3) e tem como característica a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β .

Em 1974, estudando a indução de febre por pirógenos endógenos iniciou-se os estudos que culminariam em 1979 na descrição da interleucina 1 (IL-1). Desde então, a família da IL-1 cresceu para os atuais 11 membros e várias formas e receptores solúveis ligados a membrana celular. O descobrimento do antagonista natural do receptor de interleucina-1 (IL-1ra) em fluidos biológicos humanos demonstrou a importância da IL-1 e IL-1ra em doenças humanas. Os achados demonstrando seu papel nas síndromes auto-inflamatórias (auto-imunes) e na elucidação do complexo macromolecular denominado “inflamassoma” foram fundamentais para a compreensão de ligação com a IL-1. Atualmente, o bloqueio de IL-1 como abordagem terapêutica é crucial para muitas doenças auto-inflamatórias (auto-imunes) hereditárias. (DAYER, 2017)

A primeira descrição do antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1ra) relatava que este antagonista natural bloquearia a ligação da citocina da mesma família ao seu receptor sem afetar os do TNF α (SECKINGER, 1987). A descoberta do ensaio de ligação competitiva do inibidor de IL-1 foi crucial para que pesquisadores purificassem e fizessem a clonagem da IL-1ra em 1990. (DAYER, 2017). Nos últimos

anos, vários trabalhos vem avaliando a IL-1ra em diversas patologias infecciosas virais como o SARS COV-2 e a utilização do medicamento anakinra (versão recombinante e modificada da proteína antagonista do receptor da interleucina 1 humana), porém, nenhum trabalho até a presente data avaliou o papel da IL-1ra na infecção pelo vírus sincicial respiratório.

Os linfócitos TCD8+ são responsáveis por exercer um perfil de citotoxicidade, com liberação de granzimas e perforinas, que promovem a eliminação de células neoplásicas e células infectadas por patógenos intracelulares (ABBAS, 2012).

Os linfócitos B compõem o outro grupo de células da resposta imune adaptativa, que quando ativadas, proliferam em quantidade gerando uma expansão clonal, seguida pela sua diferenciação e culminando na geração de células B de memória e de plasmócitos secretores de anticorpos (ABBAS, 2012).

BIOMARCADORES DE LESÃO TECIDUAL

Alguns biomarcadores estão relacionados a lesão tecidual, como remodelamento pulmonar e fibrose. Dentre eles, podemos citar o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) que foi descrito pela primeira vez como um fator de crescimento essencial para células endoteliais vasculares sendo produzido por diferentes tipos celulares como células tumorais, macrófagos, plaquetas, queratinócitos e células mesangiais renais. As atividades do VEGF não se limitam ao sistema vascular, mas também desempenha papel importante nas funções fisiológicas, como formação óssea, hematopoiese, cicatrização de feridas e desenvolvimento. (DUFFY, 2013)

A relaxina é um hormônio peptídico da família da insulina e está envolvida na promoção da remodelação da matriz extracelular atuando como como supressora natural de fibrose em vários tecidos como pele, pulmão, rim e coração. Ela também se mostrou eficaz na prevenção e tratamento de vários modelos de fibrose experimentais. O pulmão é um órgão alvo da relaxina sendo responsável pela diminuição da expressão de fibras colágenas dos tipos I e III e fibronectina em resposta ao fator de crescimento transformador beta (TGF β) além de promover a degradação da matriz extracelular. (BENNETT, 2009)

A linfopoetina do estroma tímico (TSLP) é produzida durante processo inflamatório alérgico por células estromais, epiteliais e queratinócitos e age na orquestração da inflamação da asma e das doenças atópicas além de atuar em eosinófilos e mastócitos aumentando a produção de citocinas. Além disso, a TSLP estimula a expressão de basófilos durante uma resposta alérgica TH2 podendo o mesmo funcionar como célula apresentadora de antígenos e pode atuar diretamente na medula óssea induzindo a hematopoese basófila independente da IL-3. Em suma, a TSLP desempenha um papel importante nos processos inflamatórios alérgicos nas respostas dos basófilos e recrutando basófilos nas respostas TH2 que podem atuar como células apresentadora de antígenos. (TELLES FILHO, 2020; WEST, 2012)

IMUNOLOGIA DA INFECÇÃO VIRAL

Os vírus são micro-organismos intracelulares obrigatórios. A utilização da máquina celular do hospedeiro, consumindo componentes do ácido nucléico e sintetizando proteínas virais são mecanismos fundamentais para sua replicação e disseminação no hospedeiro. (ABBAS, 2012)

As respostas inata e adaptativa aos vírus do sistema imune humano objetiva bloquear a infecção e eliminação das células infectadas. Os principais mecanismos da imunidade inata são a inibição da infecção por meio de interferons do tipo 1 e a ação das células NK (natural killer). Já a imunidade adaptativa contra os vírus é principalmente mediada por anticorpos que bloqueiam a ligação do vírus com as células do hospedeiro além da destruição das células infectadas por linfócitos T citotóxicos (CD8). (ABBAS, 2012).

1.4 BIOMARCADORES IMUNOPATOLOGICOS RELACIONADOS A BRONQUIOLITE

A infecção por VSR tem efeito supressor da resposta imune celular. Respostas linfoproliferativas diminuídas *in vitro* durante infecções iniciais e repetidas sugerem resposta prejudicada de células T auxiliares específicas para o VSR. Células

dendríticas infectadas com VSR diminuíram sua capacidade de ativar linfócitos CD4. (WALSH,2017)

Os IFN- α e IFN- β são muito importantes para evitar a ligação VSR nas células hospedeiras, porém, eles não são produzidos no aspirado nasal após a infecção celular. (GUO-PARKE, 2013). Já o IFN- γ , é produzido pós infecção pelo VSR, tem importante papel na atividade antiviral associado ao epitélio respiratório (GUO-PARKE, 2013; TRIPP, 2005) assim como as citocinas IL-2, IL-12 (citocinas Th1) e as citocinas IL-4, IL-5, IL-6 (citocinas Th2). (TRIPP, 2005)

Após a infecção com o VSR, as células da imunidade inata induzem a produção de citocinas séricas pró-inflamatórias que são responsáveis pela sinalização e alteração das células epiteliais, além da transcrição dos fatores NF- κ B. O VSR também é responsável pelo acúmulo de células T regulatórias (Treg) na árvore respiratória, pela diferenciação celular de linfócitos T helper para Th17, Th1 e Th2 além da produção de IL-10. (LOTZ, 2012).

As células do hospedeiro (principalmente as células epiteliais de via aérea) reconhecem o VSR via Toll-like receptor (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7) que promovem a secreção de citocinas séricas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β , IL-8 e IL-17. (LOTZ, 2012; ABU-HARB, 1999).

A Interleucina 10 (IL-10) é a principal citocina anti-inflamatória (MOORE, 2001) produzida por diferentes tipos celulares da linhagem branca sanguínea em resposta a um estímulo patogênico (COUPER, 2008; LI 2008). A produção de IL-10 pós infecção pelo VSR é extremamente necessária e benéfica, pois regula a produção em excesso de citocinas pro-inflamatórias no hospedeiro (HUNTER, 1997; STEIDLER, 2000), podendo ditar assim a gravidade da bronquiolite apresentada pelos pacientes (GENTILE, 2003).

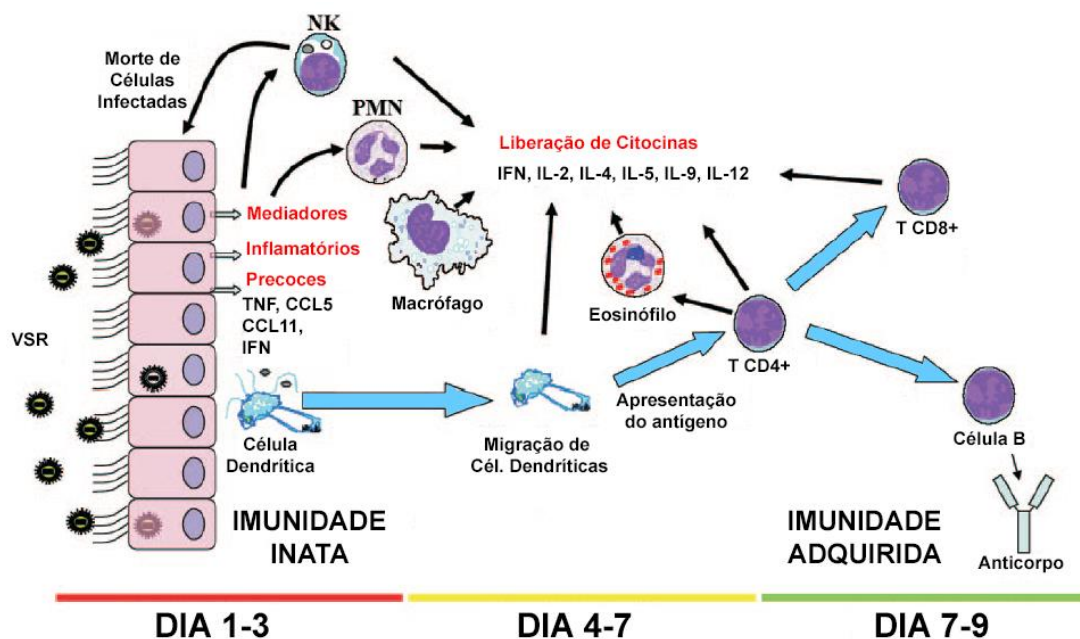


Figura 5 - Células imunes envolvidas na resposta ao VSR (adaptado de Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection, Clinical Microbiology Reviews - August 2005)

BIOMARCADORES IMUNOPATOLOGICOS RELACIONADOS A COMPLICAÇÕES DA BRONQUIOLITE

Vários estudos experimentais *in vitro* demonstram que a resposta inflamatória causada após a infecção com VSR é responsável pela produção de várias citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas, porém, a literatura mundial ainda é escassa de estudos clínicos *in vivo*.

A gravidade da bronquiolite é correlacionada com o aumento sérico de RANTES e IL-8, (BRAND, 2013) assim como o aumento nas secreções respiratórias da produção de RANTES, IL-8, (GUO-PARKE, 2013; SHEERAN, 1999; TABARANI, 2013) IL-6 (SHEERAN, 1999; TABARANI, 2013), MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-1 β , IL1-RA, IL-7 (TABARANI, 2013) IP-10 (GUO-PARKE, 2013) e diminuição IL-10 (SHEERAN, 1999).

Em estudos experimentais de cultura celular, a quantificação da carga viral está correlacionada com o aumento dos níveis de IL-6 no aspirado nasal das crianças com

Bronquiolite causadas pelo VSR (GUO-PARKE, 2013) e o aumento da IL-15 indica replicação e ativação viral (ZDRENGHEA, 2012)

O aumento do FGF *in vitro* está relacionado ao remodelamento da via aérea e manutenção da sibilância (DOSANJH, 2003). Aumento de IL-4 e IL-5 via Th2 induzem processo inflamatório pulmonar aumentando a produção de IgE atraindo mais eosinófilos aumentando o risco de asma (HOGG, 1999) assim como baixas quantidades de IL-15 indica aumento da susceptibilidade a infecções virais em pacientes com asma (ZDRENGHEA, 2012)

Em resumo, podemos sugerir que a resposta inflamatória frente a infecção pelo VSR pode ser explorada considerando as vias imunes e biomarcadores de sinalização intracelular conforme painéis abaixo:

- **Th1** – TNF, IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-8, IL-12, IL-16, IL-18
- **Th2** – IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13
- **Th 17** – IL-17, IL-22, IL-23
- **Treg** – IL-10, IL1-RA

Na literatura médica mundial existem estudos *in vitro* analisando a produção de citocinas e a ativação de inflamossomas secundária à infecção causada pelo vírus sincicial respiratório. Porém, é escassa a quantidade de trabalhos que façam essa análise *in vivo*, na faixa etária pediátrica, em diferentes amostras biológicas com suas respectivas comparações e correlações com os inflamossomas. Assim, este é o primeiro estudo que visa analisar, em crianças com Bronquiolite, um painel de citocinas nasais e séricas, e verificar suas respectivas relações com as vias de ativação celular, além de correlacioná-las com a ativação dos inflamossomas P2X7 e NLRP3 nos leucócitos periféricos.

2 OBJETIVOS GERAL

Analisar biomarcadores de agressão tecidual, citocinas pró e anti-inflamatórias e a ativação de genes de resposta imunológica inata na infecção pediátrica causada pelo VSR (Bronquiolite).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nas crianças menores de 2 anos de idade com infecção pelo VSR e no grupo controle:

- a concentração de citocinas pró-inflamatórias (ATP, IL-1 β ; IL-8; IL-5, IL-13), citocinas anti-inflamatórias (IL1-RA; IL-10) e biomarcadores de fibrose tecidual (RELAXINA 1; RELAXINA 3; IGF1, VEGF e TSLP) na secreção nasal e no sangue;
- a correlação entre biomarcadores de lesão tecidual e citocinas presentes na secreção nasal e no sangue;
- a ativação gênica da via do NALP3 em leucócitos séricos;
- a ativação gênica da via P2X7 em leucócitos séricos;
- a ativação de vias de resposta imune adaptativa (Th1, Th2, TH17 e Treg), por meio da análise em conjunto do perfil de citocinas relacionadas as respectivas vias.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente trabalho foi submetido a Plataforma Brasil e foi enviado para análise pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Nove de Julho – UNINOVE e do Conjunto Hospitalar do Mandaqui como instituição coparticipante. O parecer de ambos foi de aprovação com o número 1.021.627 de 13/04/2015 no CEP da UNINOVE (ANEXO 1) e número 1.077.316 de 27/04/2015 no CEP do Conjunto Hospitalar do Mandaqui. (ANEXO 2).

A inclusão das crianças no trabalho ocorreu somente após a leitura na íntegra de todo o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para o responsável legal, esclarecimento de quaisquer dúvidas e sua posterior assinatura. Uma cópia impressa do TCLE (ANEXO 3) era entregue imediatamente para o responsável. Foi reforçado a liberdade de se retirar do trabalho a qualquer momento sem prejuízo ao tratamento já realizado no hospital.

Trata-se de um estudo prospectivo, observacional, grupo-controle, numa coorte de pacientes pediátricos com amostra de conveniência. Os dados foram coletados no período de Maio de 2015 até Fevereiro de 2016.

3.1 CASUÍSTICA

Dois grupos foram incluídos no presente estudo. O Grupo Bronquiolite foi composto por crianças com menos de 2 anos de idade que apresentavam o primeiro episódio de sibilância da vida, cumprindo assim o principal critério para o diagnóstico de Bronquiolite.

O Grupo Controle foi comparado quanto ao sexo e composto por crianças recém-nascidas. Esse grupo foi especialmente escolhido pois as chances de infecção pelo VSR seriam remotas.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Todos os pacientes pediátricos, menores de 2 anos, de ambos os sexos internados no Conjunto Hospitalar do Mandaqui no período de Maio de 2015 até Fevereiro de 2016 com diagnóstico de Bronquiolite (primeiro episódio de sibilância) cumpriam os critérios de inclusão e compuseram o Grupo Bronquiolite.

O Grupo Controle foi composto por pacientes neonatais de ambos os sexos nascidos à termo que não apresentaram nenhuma complicação no pré-natal, parto ou infecção materna.

Foram excluídos do trabalho pacientes portadores de problemas cardíacos, pulmonares, antecedente de prematuridade ou portadores de síndromes genéticas.

3.2 MÉTODOS

Todas as crianças incluídas no estudo foram avaliadas clinicamente por pediatra qualificado; a anamnese e o exame físico foram realizados de forma rigorosa, de acordo com os preceitos da medicina contemporânea. Após, foram coletados material biológico, aspirado nasal e amostra de sangue periférico para posteriores avaliações.

COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO (aspirado nasal e sangue)

O aspirado nasal foi coletado a partir da introdução de três centímetros de uma sonda de aspiração número 6 na narina do paciente sendo posteriormente aspirado cinco mililitros de soro fisiológico estéril a 0,9% e armazenado em coletor universal estéril. Todas as amostras biológicas foram transportadas em recipiente com temperatura controladas (19 à 23°C). O processamento laboratorial ocorreu sempre no mesmo dia da coleta.

Antes de qualquer processamento, 500µl do aspirado nasal foi transferido para um criotubo corning e armazenado em nitrogênio líquido para posterior realização do painel viral. O restante do material foi transferido para um tubo falcon e centrifugado na Beckman Coulter Allerga 12R em 1.500 rpm, 4°C por 10 minutos sem break. O sobrenadante foi transferido com auxílio de ponteira estéril e pipeta automática para tubos de eppendorf transparentes de 2 mililitros previamente identificado. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -90°C da Panasonic. O material foi utilizado para realização do Painel Viral, quantificação de citocinas, dosagem de ATP extra celular (métodos descritos abaixo).

Após punção venosa, foram coletados cinco mililitros de sangue venoso do membro superior dos pacientes e armazenado em tubo plástico estéril com anticoagulante EDTA. Para o processamento do sangue contido no tubo plástico estéril com EDTA foi utilizada a centrífuga Beckman Coulter Allerga 12R. Os tubos foram centrifugados em 2.000g de rotação sob temperatura de 4°C durante 10 minutos sem break. Após a separação dos constituintes sanguíneos, o plasma foi retirado com o auxílio de ponteira estéril e pipeta automática sendo transferido para tubo de eppendorf transparente de 2 mililitros previamente identificado. Todas as amostras

foram armazenadas em freezer -90°C da Panasonic. As amostras foram separadas em alíquotas para posterior quantificação de citocinas e dosagem de ATP extra celular e análise da expressão gênica (NALP3 E P2X7) (métodos descritos abaixo).

REALIZAÇÃO DO PAINEL VÍRAL

Os criotubos armazenados em nitrogênio líquido foram enviados para o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo – USP para a realização da pesquisa do VSR utilizando o aparelho 7300 Real Time PCR System da Lifetechnologies.

A identificação viral foi necessária pois mesmo o VSR sendo o principal agente etiológico, outros tipos virais também podem causar o mesmo quadro clínico de bronquiolite, porém, poderiam produzir diferentes biomarcadores imunológicos.

QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS (aspirado nasal e plasma)

Para a análise das citocinas foram utilizados kits de ELISA das empresas R&D systems (IGF1, IL-13, IL-17, IL-23, IL1-RA, Relaxina 1, Relaxina 3 e VEGF) e da Biolegend (IL-1 β , IL-5, IL-8, IL-10 E TSLP). A quantidade de amostra biológica utilizada em cada poço foi 100 μ L do sobrenadante de aspirado nasal e 5 μ L do plasma. A aquisição dos resultados foi realizada com a da SpectraMMax i3- Molecular Devices.

Respeitando o objetivo do trabalho e focando no ineditismo dos resultados, optamos por não realizar análises de biomarcadores com amplo embasamento na literatura mundial. Frente a resposta imunológica multidirecional do vírus sincicial respiratório, idealizamos a avaliação de citocinas pró-inflamatórias (ATP, IL-1 β , IL-13, IL8, IL5) bem como o, citocinas anti-inflamatórias (IL1-ra, IL10), marcadores agressão e de fibrose pulmonar (IGF1, Relaxina 1, Relaxina 3, VEGF e TSLP).

Com os mesmos biomarcadores, pudemos também analisar a resposta imunológica dos linfócitos Th1 (IL-1 β , IL8), Th2 (IL5, IL13), Th17 (IL17, IL23) e Treg (IL10, IL1-ra) e da maturação dos linfócitos T (TSLP).

QUANTIFICAÇÃO DO ATP EXTRACELULAR (plasma)

Foram colocados 100 µL do sobrenadante de aspirado nasal e 5 µL do plasma associado a 95 µL de soro fisiológico 0,9% estéril em uma placa de 96 poços branca, estéril e de fundo plano. Para a aquisição do resultado foi utilizado o kit ATP lite-ATP Detection Assay System, -Perkin Elmer e a leitura foi realizada na SpectraMAX i3-Molecular Devices.

A análise do ATP extracelular é de fundamental importância pois demonstra quantitativamente o estado inflamatório causado pela infecção celular.

ISOLAMENTO DE RNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA (NALP3 E P2X7) POR PCR

O RNA total foi isolado do *buffy coat* de leucócitos de sangue periférico coletado com Trisol conforme protocolo estipulado em nosso laboratório. A quantidade e qualidade (280/260) do RNA foram avaliadas por meio de leitura espectrofotometria no equipamento *Nanodrop* (Thermo Scientific).

Em seguida, 500 ng de RNA total de cada amostra foram retrotranscritos utilizando o *kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a síntese, 1 µL de cDNA/ reação foi utilizado para análise de expressão relativa do gene do inflamassoma NLRP3 e do gene que codifica o gene do receptor purinérgico P2X7R por meio de sondas fluorogênicas gene-específicas de tipo *Taqman* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e qPCR. A plataforma *QuantStudioR 3 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) foi utilizada para amplificação. O software ExpressionSuite na Plataforma Cloud foi utilizado para obtenção dos dados brutos (Ct). O gene GAPDH, foram utilizados como controle endógeno para normalização dos dados brutos (Ct). Os dados de expressão dos genes foram analisados usando o método comparativo de Ct (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 Project. A normalidade dos dados foi testada via Shapiro-Wilk, porém, devido distribuição não paramétrica, foi realizado o log10 de todos os dados. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. O teste de Pearson foi utilizado para a realização da correlação entre as amostras do aspirado nasal e séricas. Os valores também foram comparados via “teste-t não pareado”, qui-quadrado, área de curva ROC pelo método de Youden e sensibilidade e especificidade pelo método de Galem & Gambino. O nível de significância utilizado foi 5% ($p < 0.05$).

O Poder da amostra para cada biomarcador foi calculado com o auxílio do programa G-Power versão 3.1.9.7. utilizando como base os “testes T” com diferença entre dois grupos independentes sendo o teste pós-hoc utilizado para calcular o poder da amostra. O α utilizado foi de 0,05 e o tamanho do efeito foi calculado utilizando a maior média subtraída da menor média dividido pelo maior desvio padrão da amostra.

4 RESULTADOS

Foram incluídas 13 crianças no Grupo Bronquiolite que cumpriam os sinais e sintomas sugestivos da doença. O painel viral foi realizado em todos os pacientes, e 2 crianças foram excluídos pela ausência do vírus sincicial respiratório na amostra. Todas as 16 amostras coletadas em crianças recém-nascidas foram incluídas no Grupo Controle.

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS GRUPOS

As características clínicas e epidemiológicas das crianças incluídas estão apresentadas na Tabela 2. De acordo com o desenho do estudo, as populações têm idades diferentes, porém, essa diferença de idade foi considerada como um fator de não interferência na análise. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a proporção masculino/feminino entre os grupos. A raça predominante foi branca e a presença de resfriado domiciliar de algum membro da família foi significativamente maior no grupo Bronquiolite. O Tabagismo gestacional ou em domicílio são descritos na literatura como fatores de risco para o desenvolvimento de Bronquiolite, porém, não foram observadas diferenças entre os grupos na estudados.

Tabela 2. Características clínica e epidemiológicas dos grupos

	Controle (n=16)	Bronquiolite (n=11)
Frequência Cardíaca (média e DP)	137 ± 11,6	144 ± 25,9
Frequência Respiratória (média de DP)	39 ± 5,7	56 ± 10,9
Saturação de Oxigênio (média e DP)	96% ±1,5	91% ± 3
Idade em dias (média e DP)	Recém-nascido **	75,3 ± 70,6
Sexo feminino (%)	75%	55%
Raça Branca (%)	80%	63%
Resfriado domiciliar (%)	5% **	72%
Tabagismo gestacional (%)	25%	27%
Tabagismo no domicílio (%)	40%	45%
Saneamento Básico (%)	90%	63%
Leucócitos (média e DP)	Não realizado	10.470 ± (4.913)
Bastonetes (média e DP)	Não realizado	0 ± (0)
Segmentados (média e DP)	Não realizado	3.458 ± (1.449)
Linfócitos (média e DP)	Não realizado	3.580 ± (1.398)
Monócitos (média e DP)	Não realizado	506 ± (270)
PCR (média e DP)	Não realizado	3.6 ± (3.18)

** = P < 0,05 controle vs Bronquiolite

O Escore de Gravidade de Wang foi aplicado para todos os pacientes e, os que cumpriam critérios para classificar a Bronquiolite como moderada ou grave (acima de 9 pontos) além de sinais clínicos como desconforto respiratório persistente associado abatimento de asas nasais, retrações intercostais, subcostais ou supraesternal, frequência respiratória maior que 70 irpm, dispneia ou cianose, hipoxemia, apneia, insuficiência respiratória aguda foram encaminhados para a UTI Pediátrica, logo, não participaram do estudo. Todos os pacientes incluídos no trabalho do grupo foram classificados pelo Escore de Gravidade de Wang como leves com média e desvio

padrão da frequência cardíaca, respiratória e saturação de oxigênio descritos na tabela 2.

Foram realizados hemogramas completos nos pacientes do Grupo Bronquiolite para quantificar os leucócitos séricos. A média da quantidade de leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos e monócitos estão descritos na Tabela 02 e demonstram que todos os pacientes do grupo controle eram imunocompetentes sendo assim possível sua utilização para avaliação das vias imunológicas e produção de citocinas séricas e nasais.

PAINEL VIRAL

O painel abaixo (Figura 2) apresenta a análise do painel viral de algumas amostras de crianças do grupo bronquiolite, e foi obtido de acordo com a técnica descrita. Cada cor da figura representa uma amostra. Podemos observar que após 21 ciclos, ocorre o aumento exponencial da fluorescência representado pela única linha que aumenta dentre as várias apresentadas confirmando a presença do VSR na amostra. Todas as 11 amostras incluídas no trabalho apresentaram o mesmo padrão evidenciado na Figura 2, comprovando a presença do vírus sincicial respiratório nas amostras de aspirado nasal.

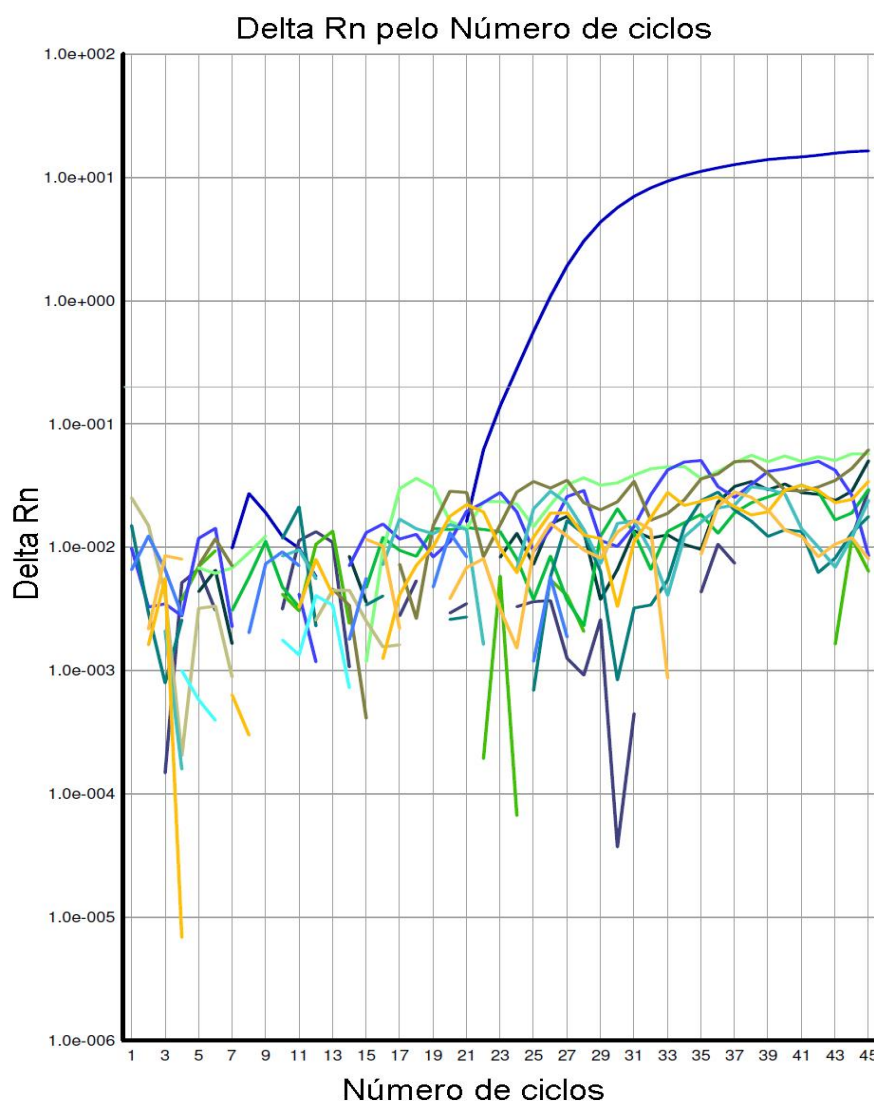


Figura 6 – Gráfico do delta RN pelo número de ciclos do PCR em tempo real.

4.2 BIOMARCADORES NASAIS.

A Tabela 3 apresenta o resultado da comparação entre os grupos de todos os biomarcadores analisados no Aspirado Nasal e seu nível descritivo ou probabilidade de significância junto do poder da amostra. Os dados com $p < 0,05$ serão representados de forma gráfica.

Tabela 3. Média, desvio padrão, valor do p do teste t e poder da amostra nos biomarcadores nasais

Biomarcadores	Controle (n=16)	Bronquiolite (n=11)	P	Poder da Amostra
ATP	6,969 \pm 0,08340	6,549 \pm 0,02743	0,0001	100%
VEGF	1,676 \pm 0,01263	1,679 \pm 0,04808	0,9418	6%
TSLP	1,090 \pm 0,05276	1,064 \pm 0,07643	0,7854	21%
RELAXINA1	2,266 \pm 0,06534	1,919 \pm 0,01349	< 0,0001	100%
RELAXINA3	1,488 \pm 0,005960	1,467 \pm 0,005473	0,0168	100%
IL23	2,538 \pm 0,005777	2,215 \pm 0,01318	< 0,0001	100%
IL17	1,240 \pm 0,01295	1,238 \pm 0,01825	0,9387	8%
IL13	2,197 \pm 0,02544	1,971 \pm 0,01358	< 0,0001	100%
IL10	0,8408 \pm 0,03189	0,8915 \pm 0,1138	0,6762	29%
IL8	1,681 \pm 0,07883	3,562 \pm 0,5742	0,0084	100%
IL5	1,007 \pm 0,02693	0,6931 \pm 0,03011	< 0,0001	100%
IL1RA	1,810 \pm 0,01803	4,407 \pm 0,5446	0,0008	100%
IGF1	2,264 \pm 0,2202	2,033 \pm 0,3681	0,5973	45%
IL1BETA	0,5331 \pm 0,02617	1,393 \pm 0,4315	0,0745	99%

Valores = Média, desvio padrão

A análise dos dados apresentados evidência que dentre os 14 biomarcadores avaliados, o Grupo Bronquiolite apresentou no aspirado nasal valores menores em 6 (ATP, RELAXINA 1, RELAXINA 3, IL-23, IL-13, IL-5) e maiores em 2 (IL-8, e IL-1RA). Os demais biomarcadores a IL-1BETA foi maior no Grupo Bronquiolite, mas sem significância estatística, e as demais, não foram diferentes entre os grupos.

Os achados sugerem imunomodulação causada pela maior quantidade de IL1-RA suprimindo as vias Th1, Th2 e Th17 no aspirado nasal, apresentando menores valores de ATP, RELAXINA 1, RELAXINA 3, IL-23, IL-13 e IL-5

A eficiência estatística de todos os biomarcadores do aspirado nasal foi avaliada pela análise da curva ROC e seu resultado está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Área, intervalo de confiança e valor do p da curva ROC dos biomarcadores nasais.

Biomarcadores	Área	Intervalo de Confiança	P
ATP	0,8352	0,6755 até 0,9950	0,003614
VEGF	0,5653	0,2976 até 0,8331	0,5704
TSLP	0,5284	0,2946 até 0,7622	0,8051
RELAXINA1	0,9972	0,9856 até 1,009	< 0,0001
RELAXINA3	0,7557	0,5658 até 0,9456	0,02642
IL23	1	1,000 até 1,000	< 0,0001
IL17	0,5256	0,2969 até 0,7542	0,8243
IL13	0,9716	0,9178 até 1,025	< 0,0001
IL10	0,5767	0,3298 até 0,8236	0,5053
IL8	0,9261	0,8321 até 1,020	0,000217
IL5	0,9858	0,9512 até 1,020	< 0,0001
IL1RA	1	1,000 até 1,000	< 0,0001
IGF1	0,8636	0,6788 até 1,048	0,001597
IL1BETA	0,733	0,4862 até 0,9798	0,04311

Valores = Média, desvio padrão

A Figura 7 demonstra que a concentração de ATP no aspirado nasal foi menor no Grupo Bronquiolite em comparação com o Grupo Controle.

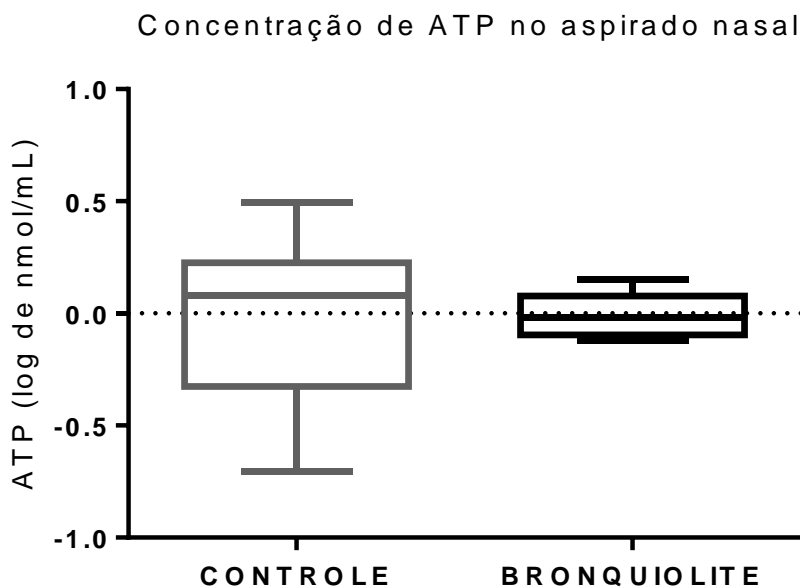


Figura 7 – Concentração de ATP no aspirado nasal dos grupos Bronquiolite e Controle.

Concentração de Relaxina - 1 no aspirado nasal

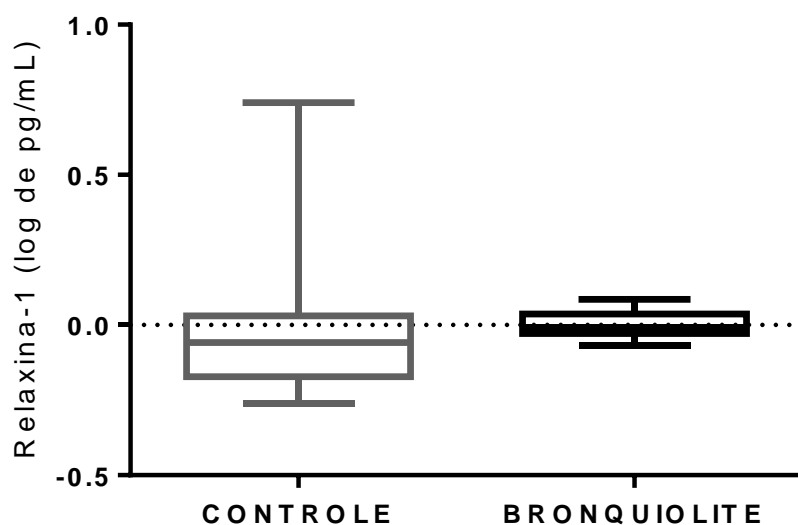


Figura 8 - Comparação da concentração de Relaxina 1 no aspirado nasal.

A figura 8 representa a menor concentração de Relaxina 1 no aspirado nasal dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

Concentração de Relaxina - 3 no aspirado nasal

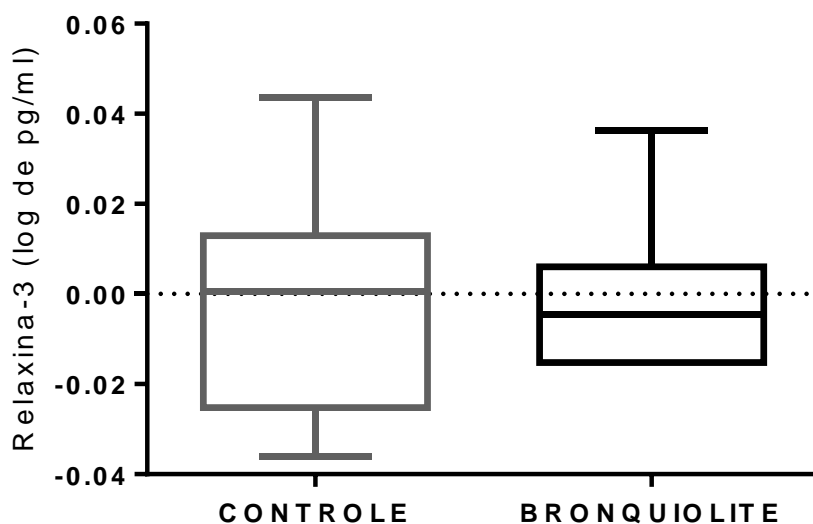


Figura 9 - Comparação da concentração de Relaxina 3 no aspirado nasal.

A figura 9 representa a menor concentração de Relaxina 3 no aspirado nasal dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

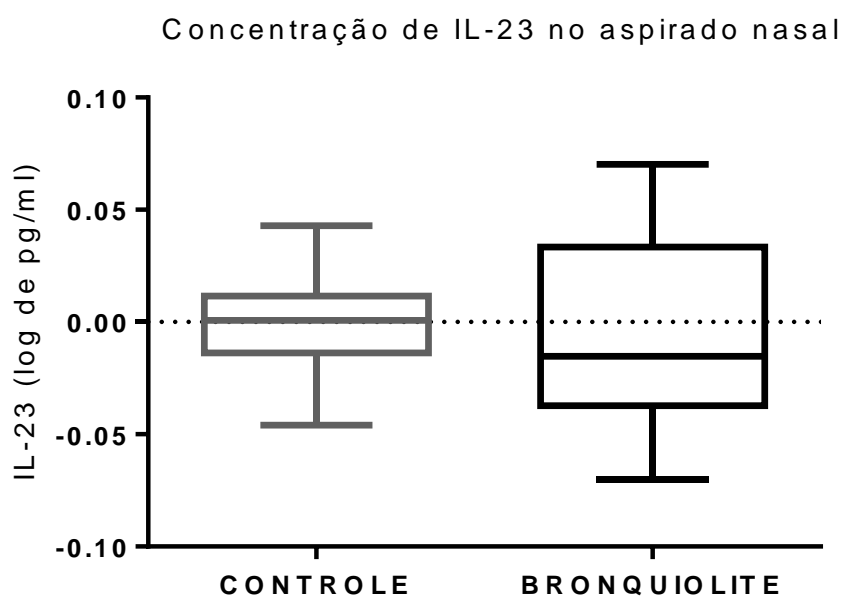


Figura 10 - Comparação da concentração de IL-23 no aspirado nasal.

A figura 10 representa a menor concentração de IL-23 no aspirado nasal dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

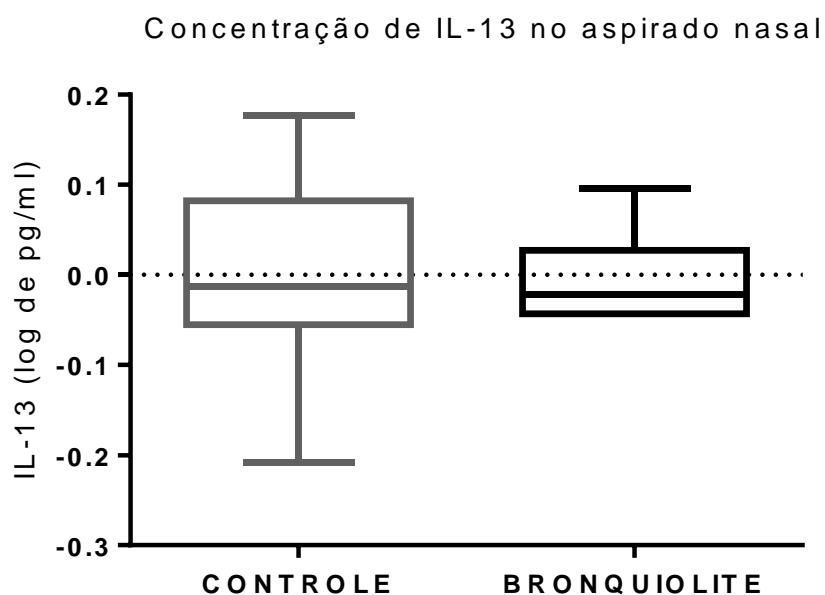


Figura 11 - Comparação da concentração de IL-13 no aspirado nasal.

A figura 11 representa a menor concentração de IL-13 no aspirado nasal dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

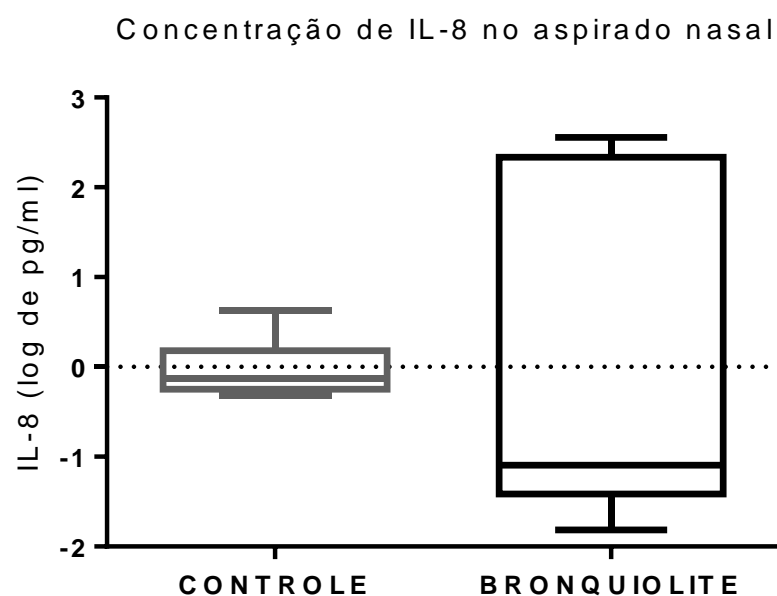


Figura 12 - Comparação da concentração de IL-8 no aspirado nasal.

A figura 12 representa a maior concentração de IL-8 no aspirado nasal dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

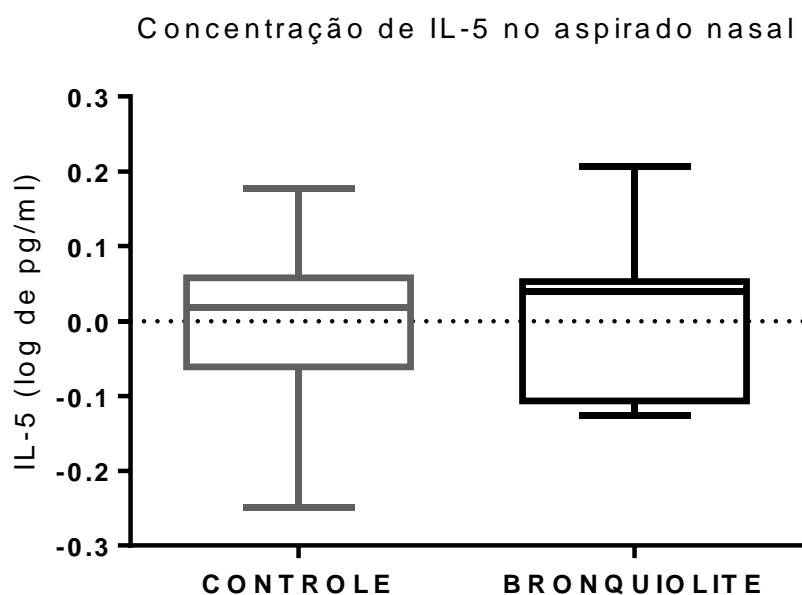


Figura 13 - Comparação da concentração de IL-5 no aspirado nasal.

A figura 13 representa a menor concentração de IL-5 no aspirado nasal dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

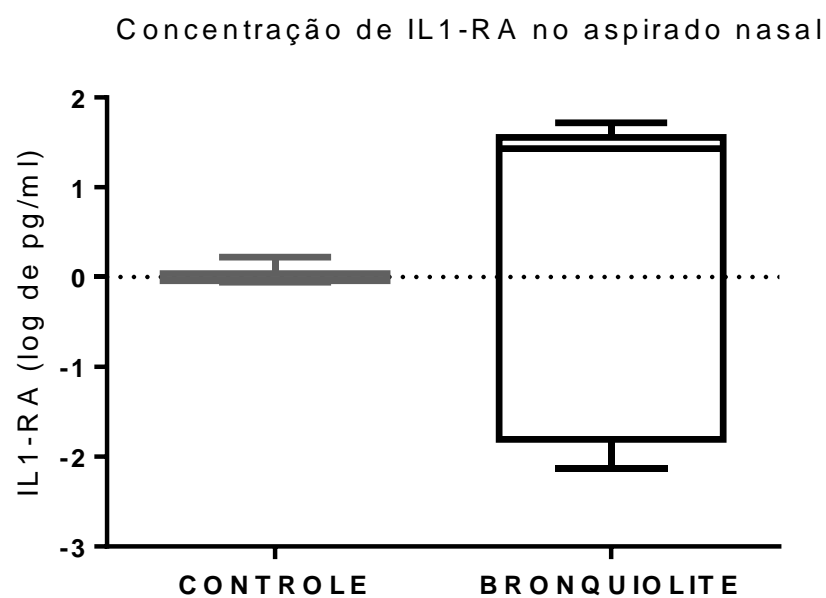


Figura 14 - Comparação da concentração de IL1-RA no aspirado nasal.

A figura 14 representa a maior concentração de IL1-RA no aspirado nasal dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

4.3 BIOMARCADORES SÉRICOS.

A Tabela 5 apresenta o resultado da comparação entre os grupos de todos os biomarcadores analisados no sangue e seu nível descritivo ou probabilidade de significância. Os dados com $p < 0,05$ serão representados de forma gráfica.

Tabela 5. Média, desvio padrão, valor do p do teste t e poder da amostra nos biomarcadores séricos

Biomarcadores	Grupo Controle (n=16)	Grupo Bronquiólite (n=11)	P	Poder da Amostra
ATP	7,500 ± 0,1007	7,636 ± 0,1314	0,4221	81%
VEGF	1,709 ± 0,05331	1,653 ± 0,04021	0,4111	83%
TSLP	1,063 ± 0,05552	1,070 ± 0,06964	0,9369	8%
RELAXINA1	2,063 ± 0,05736	1,975 ± 0,01288	0,1537	98%
RELAXINA3	1,545 ± 0,03380	1,489 ± 0,009627	0,1308	98%
IL23	2,406 ± 0,01021	2,459 ± 0,01670	0,0134	100%
IL17	1,238 ± 0,01607	1,210 ± 0,01050	0,1694	99%
IL13	2,061 ± 0,03868	2,008 ± 0,005590	0,1914	96%
IL10	0,9631 ± 0,08099	0,9517 ± 0,06242	0,9124	9%
IL8	1,619 ± 0,09244	1,515 ± 0,07308	0,3855	87%
IL5	0,6732 ± 0,01668	0,6643 ± 0,02528	0,7737	21%
IL1RA	1,994 ± 0,2688	1,684 ± 0,03684	0,2704	88%
IGF1	2,454 ± 0,2107	2,289 ± 0,03284	0,4492	61%
IL1BETA	0,4325 ± 0,02033	0,3596 ± 0,02441	0,0317	100%

Valores = Média, desvio padrão

A análise dos dados apresentados na Tabela 5 evidencia que dentre os 14 biomarcadores avaliados, o Grupo Bronquiólite apresentou valores menores em 1 (IL-1B) e maiores em 1 (IL-23) comparado ao Grupo Controle. Os demais biomarcadores não foram diferentes entre os grupos. Esses achados podem ser justificados pela classificação leve de gravidade dos pacientes pertencentes ao grupo bronquiólite visto que a infecção pelo vírus sincicial respiratório deva estar localizada apenas no epitélio respiratório sem repercussão sistêmica.

A eficiência estatística de todos os biomarcadores do aspirado nasal foi avaliada pela análise da curva ROC e seu resultado está descrito na tabela 6.

Tabela 6. Área, intervalo de confiança e valor do p da curva ROC dos biomarcadores séricos dos grupos.

Biomarcadores	Área	Intervalo de Confiança	P
ATP	0,6477	0,4283 até 0,8672	0,1995
VEGF	0,5625	0,3381 até 0,7869	0,5873
TSLP	0,5057	0,2789 até 0,7325	0,9606
RELAXINA1	0,5739	0,3487 até 0,7990	0,5212
RELAXINA3	0,6392	0,4239 até 0,8545	0,2267
IL23	0,7926	0,6246 até 0,9606	0,01107
IL17	0,6705	0,4572 até 0,8837	0,1388
IL13	0,5256	0,3057 até 0,7455	0,8243
IL10	0,5568	0,3368 até 0,7769	0,6217
IL8	0,554	0,3336 até 0,7744	0,6392
IL5	0,5795	0,3509 até 0,8082	0,4897
IL1RA	0,6193	0,4039 até 0,8348	0,3001
IGF1	0,5341	0,2955 até 0,7727	0,7672
IL1BETA	0,7415	0,5477 até 0,9353	0,03602

Valores = Média, desvio padrão

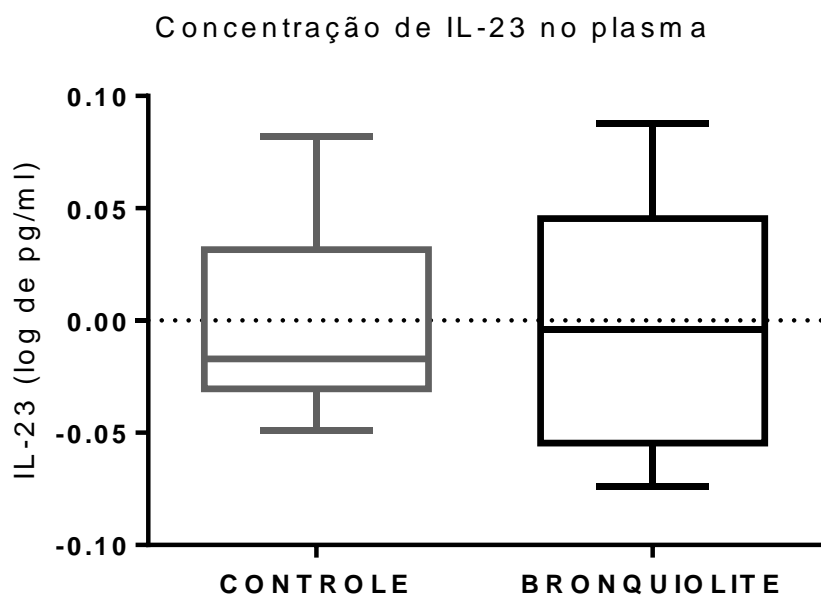


Figura 15 - Comparação da concentração de IL-23 no plasma.

A figura 15 representa a maior concentração de IL-23 no plasma dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

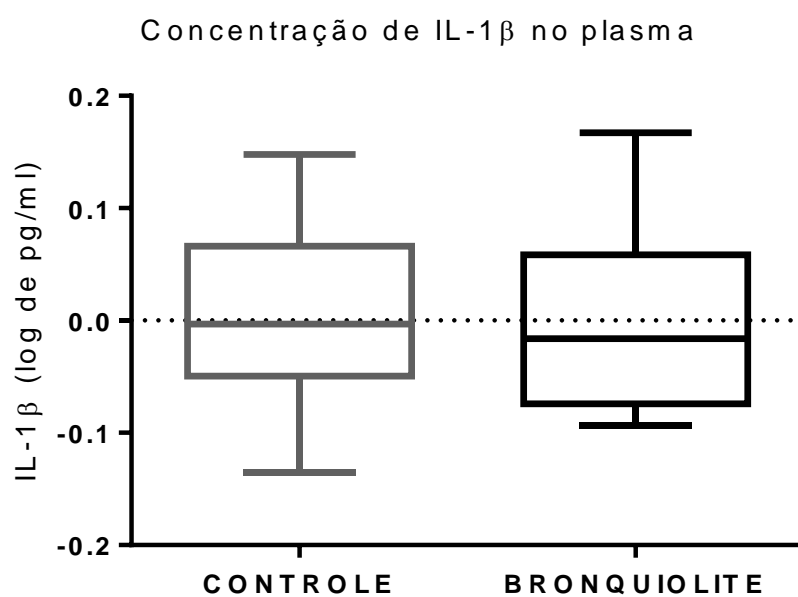


Figura 16 - Comparação da concentração de IL1- β no plasma.

A figura 16 representa a menor concentração de IL1- β no plasma dos pacientes do grupo bronquiolite em comparação ao grupo controle.

4.4 CORRELAÇÃO DOS BIOMARCADORES SÉRICOS E NASAIS NOS PACIENTES COM BRONQUIOLITE

A Tabela 7 apresenta o resultado da correlação entre todos os biomarcadores analisados no aspirado nasal e sangue dos pacientes infectados pelo vírus sincicial respiratório e seu nível descritivo ou probabilidade de significância. Nenhum dos biomarcadores analisados apresentou correlação significativa com $p < 0,05$.

Com o objetivo explicar algum fenômeno estatístico e determinar se os biomarcadores independentes influenciam nos dependentes foi realizada análise de regressão em todos os 14 biomarcadores. Nenhum dos biomarcadores analisados apresentou valores significativos com $p < 0,05$.

Dentre os 14 biomarcadores, observamos que somente o IL-23 teve alteração significativa entre os grupos, porém houve comportamento oposto – aumentou no aspirado nasal e reduziu no sangue.

Tabela 7. Correlação entre a quantificação de biomarcadores nasais e séricos do Grupo Bronquiolite.

Biomarcadores	r	P
ATP	-0,1	0,7605
VEGF	0,34	0,3119
TSLP	-0,1	0,7686
RELAXINA1	-0,16	0,6355
RELAXINA3	-0,19	0,5661
IL23	0,22	0,5087
IL17	0,54	0,0837
IL13	-0,24	0,4852
IL10	0,49	0,1283
IL8	0,34	0,3033
IL5	0,3	0,3764
IL1RA	-0,4	0,2195
IGF1	0,27	0,4153
IL1BETA	-0,077	0,8219

4.5 EXPRESSÃO GÊNICA DO P2X7 PURINÉRGICO

Não foi observada diferença estatística entre os dois grupos estudados na expressão gênica do receptor purinérgico *P2X7R* em leucócitos, que é um dos principais receptores de ativação durante o período de inflamação mediada por células de resposta imune inata (Figura 17)

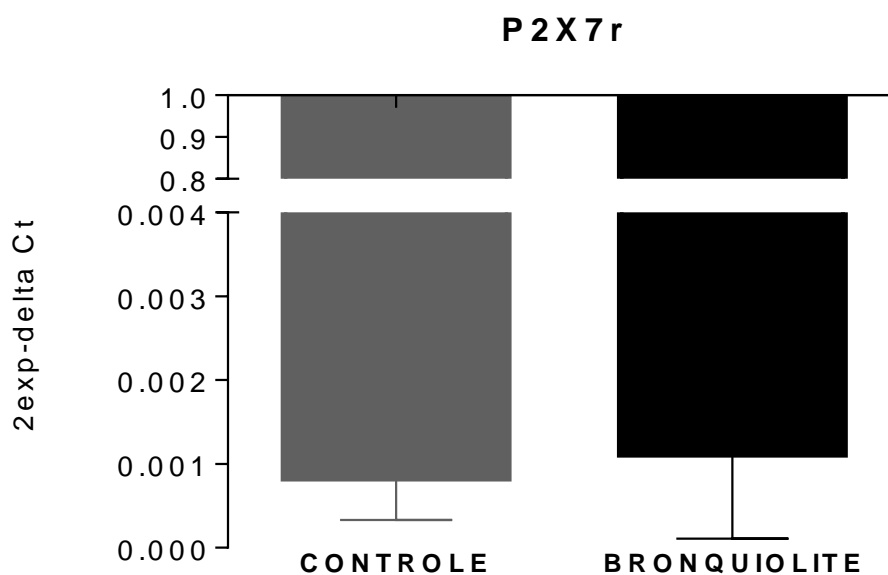


Figura 17 - Expressão do gene P2X7 em leucócitos séricos

4.6 EXPRESSÃO GÊNICA DO NLRP3 INFLAMASSOMA

Com o objetivo de avaliar se a via inflamatória do inflamassoma NLRP3 estava ativa em leucócitos séricos, a expressão gênica do receptor de NALP3 foi realizada e descrita com o gráfico abaixo:

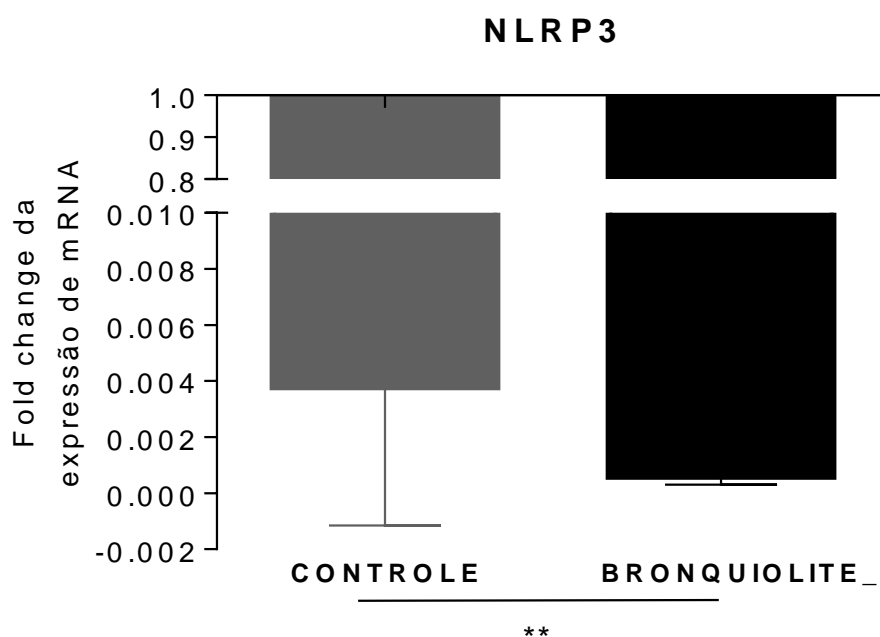


Figura 18 - Expressão do gene NLRP3 em leucócitos séricos

A figura 18 demonstra graficamente a menor expressão gênica do NLRP3 nos leucócitos das crianças com infecção pelo VSR em comparação ao controle demonstrando um discreto down regulation, com valor de p 0,0093.

De forma resumida, observamos nesse trabalho que os pacientes classificados pelos scores clínicos como forma leve de Bronquiolite apresentaram no aspirado nasal menor concentração de ATP, RELAXINA 1, RELAXINA 3, IL-5, IL-13, e IL-23, e maior concentração de IL1-RA e IL-8 em comparação ao grupo controle. No sangue observamos nos pacientes com bronquiolite uma menor concentração de IL1- β e

maior de IL-23 em comparação com o grupo controle. Não foram observadas correlações entre os biomarcadores séricos e do aspirado nasal.

Na análise sérica da expressão gênica, não foi observada diferença na expressão do gene P2X7, porém observou-se um *down regulation* do gene NLRP3 nos pacientes com bronquiolite. Esse dado tem consonância a menor quantidade de IL1-B no plasma dos pacientes com bronquiolite, sendo esse o nosso principal resultado.

5 DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo foram a demonstração de que pacientes pediátricos menores de 2 anos de idade, com diagnóstico clínico de bronquiolite leve causada pelo VSR, apresentaram no aspirado nasal valores significativamente menores dos biomarcadores ATP, RELAXINA 1 e RELAXINA 3, e das citocinas IL-5, IL-13 e IL-23, e maiores valores das citocinas IL-8, e IL-1RA, comparadas ao grupo controle. Ainda, evidenciamos, de maneira pioneira, que a infecção pelo VSR é capaz de realizar um down regulation no inflamassoma NLRP3 em leucócitos séricos em pacientes clinicamente caracterizados como leve.

O VSR é capaz de provocar diferentes graus de resposta inflamatória quando contamina crianças saudáveis causando a patologia denominada bronquiolite (LEGG, 2003; CHRISTIAANSEN, 2014). Porém, os mecanismos regulatórios da resposta inflamatória ainda não estão totalmente esclarecidos.

A infecção pelo VSR nas células do epitélio respiratório dos pacientes estudados não foi suficiente para aumentar a quantidade de ATP extracelular no aspirado nasal. Dessa forma, podemos inferir uma associação desse biomarcador com uma reduzida produção de ROS e consequente redução de demais biomarcadores como RELAXINA 1 e RELAXINA 3, e das citocinas IL-5, IL-13 e IL-23

Estudos prévios dosando citocinas nasais e séricas em pacientes com Bronquiolite, geraram diferentes resultados. Nossos dados apontaram para um efeito estimulador na via Th1 (IL-8) e um aumento do modulador da principal citocina dessa via (IL-1RA) além de efeito supressor das vias Th2 (IL-5, IL-13) e Th17 (IL-23). CHRISTIAANSEN e cols. 2016 demonstraram aumento nas citocinas associadas a via Th1 (IFN- γ e TNF- α) e Th2 (IL-4), resultados esses que foram corroborados por TABARANI, 2013. No nosso trabalho não foram quantificadas as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-4, visto sua correlação prévia com a infecção pelo VSR. Os mesmos autores demonstraram que mesmo com diferença estatística, ocorre a baixa expressão de citocinas no aspirado nasal. Esses dados são semelhantes aos nossos pois quantificação de citocinas nasais foi menor quando comparada a quantificação sérica

CHRISTIAANSEN e cols. 2016 também descreveram a redução da IL-33 em bebês infectados por VSR, resultado esse diferente do observado em outros estudos

realizados em humanos e modelos animais (SARAIVA, 2015; ZENG, 2015). Esse resultado que pode ser justificado pela gravidade da manifestação clínica dos pacientes. Assim, em sua amostra valores aumentados da citocina teve relação com a gravidade dos pacientes, e pode estar correlacionada a morte de células endoteliais por apoptose. Mesmo não sendo dosada a IL-33 em nossos pacientes acreditamos que nossos resultados seriam semelhantes a SARAIVA e cols., 2015, pois além da amostra ser semelhante entre os estudos, encontramos menor quantificação de IL-5 e IL-13 e a IL-33.

Os sinais e sintomas relacionados a bronquiolite como a sibilância, utilização de musculatura acessória e insuficiência respiratória são classicamente correlacionados a citocinas Th17 como a IL-17 e IL-23. Não foram identificadas diferenças estatísticas no nosso trabalho com relação a IL-17, encontrando-se a IL-23 reduzida. Acasos semelhantes foram relatados anteriormente por CHRISTIAANSEN e cols., 2016.

Em nosso trabalho, ao fazer a análise sérica dos biomarcadores, os pacientes pediátricos menores de 2 anos de idade, com diagnóstico clínico de bronquiolite leve causada pelo vírus sincicial respiratório valores menores de IL-1 β e maiores de IL-23 em comparação ao Grupo Controle. Vários são os artigos descrevendo que a infecção pelo VSR causa secreção de IL-1 β (BLANCO, 2002; GUERRERO-PLATA, 2005; BERMEJO-MARTIN, 2007), porém, esses achados podem ser justificados pela independência da resposta imunológica ocorrida sistemicamente e no epitélio respiratório, visto que todos os pacientes com bronquiolite foram classificados como leves.

Não conseguimos correlacionar os valores dos biomarcadores presentes no aspirado nasal e no plasma de pacientes pediátricos com quadro leve bronquiolite causada pelo VSR. Esse achado pode ser secundário a classificação da amostra como bronquiolite leve ou pela resposta imunológica local ocorrendo de forma diferente da sistêmica. Outros estudos utilizando pacientes classificados como intermediários ou graves poderão ser realizados para a avaliação da existência da correlação. Esse é o primeiro trabalho a fazer a correlação entre biomarcadores do mesmo paciente em diferentes sítios

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do corpo humano contra agentes externos como vírus ou bactérias. A IL-1 β é uma citocina produzida pela resposta imune inata e desempenha papel fundamental na resposta inflamatória contra a

invasão de agentes patogênicos. IL-1 β é sintetizado inicialmente de forma imatura (pró-IL-1 β) sendo necessária sua clivagem pela via das caspases (caspase-1) para que a IL-1 β madura fique ativa e seja secretada (SEGOVIA, 2012). Os inflamassomas são componentes vitais na regulação saúde-doença e são indispensáveis para ativação da caspase-1. Padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) de várias doenças e alterações genéticas estão associados a ativação do. Como exemplo de DAMPs ativando o inflamassoma NLRP3 podemos citar os cristais de colesterol na aterosclerose, a glicose na diabetes e o ATP nas atopias respiratórias e inflamações crônicas. (SEGOVIA, 2012)

Infecções por agentes patogênicos como vírus, bactérias, fungos e parasitas também desencadeiam a formação e ativação dos inflamassomas pois. essa resposta inflamatória é fundamental para a eliminação do patógeno e induzir uma imunidade adaptativa eficaz. Os vírus (DNA ou RNA) utilizam vários inflamassomas para ativação da caspase-1 e consequente secreção de IL-1 β . Por exemplo o citomegalovírus utiliza o inflamassoma AIM2 e o adenovírus, herpes vírus e o vírus influenza A utilizam o inflamassoma NLRP3 para a ativação da caspase-1 para liberação de IL-1 β . (SEGOVIA, 2012)

A ativação do inflamassoma NLRP3 na infecção pelo vírus influenza A em humanos confere condições adequadas nas vias aéreas para eliminação do vírus do trato respiratório. Entre os vírus respiratórios humanos, a formação do inflamassoma era apenas descrito após a infecção pelo vírus influenza A. O VSR é semelhante ao vírus influenza A, e as características e mecanismos de infecção começaram a ser estudados recentemente. A primeira descrição do VSR foi feita por SEGOVIA e cols., 2012 em estudos com cultura celular de monócitos de camundongo que demonstrou que o VSR é capaz de sozinho ativar o complexo inflamassoma NLRP3, que ativa a caspase-1 resultando na secreção de IL-1 β . TRIANTAFILOU e cols. ,2012 continuaram a investigação desse mecanismo ainda com cultura de células, porém, utilizando células epiteliais de pulmão humano. Os resultados reforçaram o achado que o VSR é capaz de sozinho ativar o NLRP3. Foram a partir dessas observações que nosso grupo propôs a investigar se a mesma resposta acontecia *in vivo* e sistemicamente.

Evidenciamos no nosso trabalho de maneira pioneira que pacientes menores de 2 anos de idade com bronquiolite classificada como leve o VSR não é capaz de ativar

o inflamassoma NLRP3 em leucócitos séricos e consequentemente aumentar a produção de IL-1 β , resultado esse diferente do encontrado nos estudos com culturas celulares demonstrando que o processo já descrito na literatura médica pode deva estar restrito apenas ao epitélio respiratório humano.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) também são utilizadas como sinais para a ativação do inflamossoma NLRP3 na infecção pelo VSR. ROS também ativa caspase-1 em outras situações clínicas como no diabetes, após a exposição a poluentes (amianto e sílica), infecções virais (vírus influenza A, adenovírus), infecções fúngicas (*Aspergillus fumigatus*) e parasitárias (malária) (SEGOVIA, 2012).

Altas concentrações de inibidor de ROS são capazes de reduzir a expressão do gene NLRP3 e consequentemente não ativar caspase-1 diminuindo a quantidade de IL-1 β . (SEGOVIA, 2012). Acreditamos que esse mecanismo não está relacionado aos resultados descritos visto que os pacientes foram classificados como bronquiolite leve e não tiveram quadros graves com resposta inflamatória sistêmica.

O VSR ao infectar a célula, modifica a permeabilidade da membrana celular facilitando o efluxo de potássio e utiliza a máquina celular para a produção de poros de membrana (proteína SH) chamados vioporinas que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas facilitando assim o mecanismo de entrada e saída de novos vírus funcionando também para a ativação do NLRP3. A vioporina junta-se a uma lista ampla de proteínas virais que formam canais iônicos quando infectados com outros vírus como o picornavírus, HIV-1, HCV e vírus da gripe. O uso de drogas que bloqueiam os canais iônicos virais foram capazes de inibir a secreção de IL-1 β podendo ser uma opção para os pacientes que evoluem clinicamente de forma grave. (TRANTAFILOU, 2012)

As hipóteses inicialmente formuladas foram por completo respondidas com o presente estudo. Conseguimos demonstrar que em pacientes menores de 2 anos com Bronquiolite leve causada pelo VSR não existe correlação entre os biomarcadores séricos e nasais e que não ocorre de maneira sistêmica a ativação gênica da via dos inflamossomas e purinérgicos. Esse achado corrobora a observação clínica pois as crianças com bronquiolite apresentam alterações de exame físico e complicações exclusivamente do aparelho respiratório, poupando os demais sistemas (cardiovasculares, renal, hepático, sistêmico). Esse achado é muito importante pois pode guiar os pesquisadores mundiais a produção de fármacos de ação local (spray

nasal) visto que sua administração sistemicamente não seria necessária pela própria fisiopatologia do vírus. Especialmente na faixa etária pediátrica, o fato de administrar medicações de maneira não invasiva auxilia na facilidade e no aumento da adesão ao tratamento pelo paciente e familiares.

Outros estudos ampliando a investigação dos fenômenos descritos são necessários. A avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 no epitélio respiratório humano em paciente com bronquiolite leve pode comprovar que a resposta inflamatória nesse grupo de paciente se manteve localizada no aparelho respiratório. Outros estudos com o mesmo grupo, porém com diferentes classificações de gravidade (pacientes moderados ou graves) associado a diferentes desfechos (internação na UTI Pediátrica, utilização de ventilação pulmonar mecânica ou óbito) são necessários para continuar a investigação e analisar se nessa população são descritas diferenças ou correlações nos biomarcadores séricos e nasais, além de estudar se ocorre a ativação sistêmica do inflamassoma NLRP3, ativação da caspase-1 e posteriormente a produção sérica de IL-1 β . A quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e suas correlações com os demais estudos sugeridos também auxiliará na elucidação dos mecanismos biológicos frente ao vírus sincicial respiratório.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HALL, JE – **GUYTON & HALL Tratado de Fisiologia Médica 13ªed.** - Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
2. MATSUNO, AK – **Insuficiência respiratória aguda na criança.** Simpósio: Emergências Pediátricas: Capítulo II – Revista faculdade de medicina de Ribeirão Preto da USP, 2012.
3. KLIEGMAN, RM et al – **Nelson – Princípios de pediatria 5ªed-** Rio de Janeiro: Elsevier, 2016
4. Piva JP, Garcia PC, Santana JC, Barreto SS. **Respiratory failure in the child.** J Pediatr (Rio J) 1998.
5. American Heart Association, **PALS – Pediatric Advanced Life Support – Provider Manual.** 2010.
6. BRASILEIRO-FILHO, G - **Bogliolo Patologia 9ªed.**– Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
7. TORTORA, GJ et al – **Microbiologia 10ªed.** – Porto Alegre: Artmed, 2012.
8. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
9. SALOMÃO JUNIOR. JB et al – **Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection.** J Pediatr (Rio J). 2011.
10. Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP). Diretrizes para o Manejo da Infecção Causada pelo Vírus Sincicial Respiratório (VSR) - 2017. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/Diretrizes_manejo_infeccao_causada_VSR2017.pdf. Acessado em: 10/10/2020.
11. TELLES FILHO PA – **Asma Brônquica. Resposta Tardia da Asma,** Em Informações médicas 1997 - 2020. Disponível em : http://www.asma-bronquica.com.br/medical/resposta_tardia_linfocitos.html. Acessado em: 10/10/2020
12. HALL, CB et al - **The burden of respiratory syncytial virus infection in young children.** N Engl J Med. 2009.

13. **RICCETO, AGL et al - Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Infants Hospitalized for Acute Lower Respiratory Tract Disease: Incidence and Associated Risks.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2006.
14. **SHAY, DK et al - Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996.** JAMA. 1999.
15. **Sistema Único de Saúde (SUS) – Disponível em:** <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS> . Acessado em 10/10/2020.
16. **VIEIRA, SE et al. - Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil.** Rev Inst Med Trop S Paulo. 2001.
17. **MOORE, K.W et al. - Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** Annu Rev Immunol, 2001.
18. **COUPER, K. N; BLOUNT, D.G; RILEY, E.M. – IL-10: the master regulator of immunity to infection.** J Immunol, 2008.
19. **LI, M.O; FLAVELL, R.A – Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10.** Immunity 2008.
20. **HUNTER CA, et al – IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with Trypanosoma cruzi.** J Immunol, 1997.
21. **STEIDLER, L. et al – Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10.** Science, 2000.
22. **BENNETT RG. - Relaxin and Its Role in the Development and Treatment of Fibrosis.** Transl Res. 2009.
23. **WEST EE, KASHYAP M, LEONARD WJ. TSLP: A key regulator of asthma pathogenesis.** Drug Discov Mech, 2012.
24. **GENTILE DA et al – Cytokine gene polymorphisms moderate illness severity in infant with respiratory syncytial virus infection.** Hum Immunol – 2003
25. **MULLER, T et al – A potencial role for P2X7r in allergic airway inflammation in mice and humans.** Am J Respir Cell and Moll Biology, 2011
26. **GUO-PARKE, H; et al - Relative Respiratory Syncytial Virus Cytopathogenesis in Upper and Lower Respiratory Tract Epithelium.** Am J Respir Crit Care Med, 2013.

27. SHEERAN, P; et al - **Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease.** *Pediatr Infect Dis J*, 1999.
28. ABU-HARB, M; et al - **IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis.** *Eur Respir J*, 1999.
29. TABARANI, CM; et al - **Novel Inflammatory Markers, Clinical Risk Factors, and Virus Type Associated with Severe Respiratory Syncytial Virus Infection.** *Pediatr Infect Dis J*, 2013.
30. ZDRENGHEA, MT; et al - **RSV infection modulates IL-15 production and MICA levels in respiratory epithelial cells.** *Eur Respir J*, 2012.
31. DOSANJH, A; REDNAM, S; MARTIN, M. - **Respiratory syncytial virus augments production of fibroblast growth factor basic in vitro: implications for a possible mechanism of prolonged wheezing after infection.** *Pediatr Allergy Immunol*, 2003.
32. BRAND, HK; et al - **CD4+ T-cell counts and interleukin-8 and CCL-5 plasma concentrations discriminate disease severity in children with RSV infection.** *Pediatr Res*, 2013.
33. TRIPP, RA; OSHANSKY, C; ALVAREZ, R – **Cytokines and respiratory syncytial virus infections.** *Proc Am Thorac Soc*, 2005.
34. HOGG, JC. – **Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease.** *Am J Respir Crit Care Med*, 1999.
35. VENTO G, et al - **Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: correlations with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia** - *Intensive Care Med*, 2006.
36. PAANANEN R, et al - **Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia.** - *J Pediatr*, 2009
37. AMBALAVANAN N, et al - **Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants.** - *Pediatrics* 2009.
38. BHANDARI A; BHANDARI V - **Biomarkers in Bronchopulmonary Dysplasia** - *Paediatric Respiratory Reviews* 14, 2013.
39. BHANDARI A; BHANDARI V; PITFALLS - **Problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia.**- *Pediatrics*, 2009.

40. BHANDARI V, GRUEN JR. - **The genetics of bronchopulmonary dysplasia.**
- Semin Perinatol, 2006.
41. SAVIO LEB, et al - **The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon?** - Front. Pharmacol, 2018.
42. DUFFY AM, BOUCHIER-HAYES DJ, HARMEY JH. - **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF.** In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6482/> .Acessado em : 10/10/2020
43. BOSE C; DAMMANN CE; LAUGHON MM - **Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate.** - Arch Dis Child Fetal Neonatal, 2008.
44. HASAN J, et al - **Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in tracheal aspirate fluid of preterm neonates at birth may be predictive of bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease.** – Pediatrics, 2009.
45. MELLER S; BHANDARI V - **VEGF levels in humans and animal models with RDS and BPD: temporal relationships.** - Experimental lung research, 2012.
46. MATTHEW T, LOTZ R - **Mechanisms of Respiratory Syncytial Virus Modulation of Airway Immune Responses** - Curr Allergy Asthma Rep , 2012.
47. FRICK, OL; GERMAN DF; MILLS J - **Development of allergy in children. I. Association with virus infections.** - J Allergy Clin Immunol, 1979.
48. PULLAN CR; HEY EM - **Wheezing, asthma, and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy.** - Br Med J (Clin Res Ed), 1982.
49. REMICK DG - **Interleukin-8.** Crit Care Med, 2005.
50. GAROFALO R, et al - **Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation.** - J Virol, 1996.
51. WEBER A; et al - **Interleukin-1 (IL-1) pathway.** Sci Signal, 2010.
52. DAVIS BK; WEN H; TING JP - **The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases.** Annu Rev Immunol. 2011..

53. SEGOVIA J, et al - **TLR2/MyD88/NFkappaB pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. Helps elucidate the mechanism of IL-1 β production in macrophages during RSV infection.** - PLoS One, 2012.
54. AKIRA S, et al – **Pathogen recognition and innate immunity.** Cell. 2006.
55. BEUTLER B, et al – **Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large.** Annu Rev Immunol. 2006.
56. BARBÉ, F, et al – **Advances in Nod-like receptors (NLR) biology.** Cytokine Growth Factor Rev. 2014.
57. MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J. – **The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β .** Mol Cell, 2002.
58. SINGHAL G, et al – **Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review.** Front Neurosci, 2014.
59. RATHINAM VAK, FITZGERALD KA - **Inflammasome complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions.** Cell, 2016.
60. DRAJAC C, et al. - **Pulmonary Susceptibility of Neonates to Respiratory Syncytial Virus Infection: A Problem of Innate Immunity?.** Journal of Immunology Research, 2017.
61. DAYER, JM; OLIVIERO, F; PUNZI, L - **A Brief History of IL-1 and IL-1 Ra in Rheumatology.** Front. Pharmacol., 2017
62. MARTINS ALO, et al. - **Incidência de infecções comunitárias de vias aéreas inferiores em crianças.** Sociedade de Pediatria de São Paulo, 2016.
63. PERALES, JG; PISTE, IP; COSTA JUNIOR, A – **Doenças respiratórias na infância: aspectos moleculares, clínicos e cirúrgicos.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
64. YANG, Y et al - **Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors,** Cell Death & Disease, 2019.
65. WALSH EE; HALL CB – **Respiratory Syncytial Virus (RSV).** 2017. Disponível em : <https://oncohemakey.com/respiratory-syncytial-virus-rsv/#bib12>. Acessado em 10/10/2020
66. SECKINGER, P. et al - **A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding.** J. Immunol, 1987.

67. SECKINGER, P. et al - **A urine inhibitor of interleukin 1 activity affects both interleukin 1 alpha and 1 beta but not tumor necrosis factor alpha.** J. Immunol, 1987.
68. LECHTENBERG BC, MACE PD, RIEDL SJ - **Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling.** Curr Opin Struct Biol, 2014.
69. TRIANTAFILOU, K. et al – **Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation.** Thorax, 2012.
70. LEGG JP, et al - **Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis.** Am J Respir Crit Care Med 2003
71. CHRISTIAANSEN AF, et al - **The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection.** Immunol Res 2014
72. CHRISTIAANSEN AF, et al - **Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants,** Pediatr Res. 2016
73. TABARANI CM et al. - **Novel inflammatory markers, clinical risk factors and virus type associated with severe respiratory syncytial virus infection.** Pediatr Infect Dis J 2013
74. SARAIVA J et al. - **Respiratory syncytial virus disease is mediated by age-variable IL-33.** PLoS Pathog 2015
75. ZENG S, et al - **IL-33 receptor (ST2) signalling is important for regulation of Th2-mediated airway inflammation in a murine model of acute respiratory syncytial virus infection.** Scand J Immunol 2015
76. BLANCO JC, et al - **Cytokine and chemokine gene expression after primary and secondary respiratory syncytial virus infection in cotton rats.** J Infect Dis 2002.
77. GUERRERO-PLATA A, CASOLA A, GAROFALO RP - **Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus.** J Virol , 2005.
78. BERMEJO-MARTIN JF, et al - **Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children.** Eur Cytokine Netw 2007.

7 GLOSSÁRIO

ATP - Adenosina Trifosfato é uma molécula de alta energia encontrada em todas as células. Seu papel é fornecer a célula energia necessária para funcionamento do metabolismo celular. Outro papel da molécula de ATP é como mediadora na inflamação aguda e crônica e pode ser liberado em grandes quantidades a partir de vários tipos de células após estresse celular ou lesão tecidual.

CITOCINAS - Proteínas produzidas por tipos diferentes de células que mediam as reações inflamatórias e imunológicas. As citocinas são as principais mediadoras entre a comunicação das células do sistema imunológico.

ESPECIFICIDADE - É a capacidade que o teste diagnóstico/triagem tem de detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos sadios.

IGF-1 - É um mediador primário dos efeitos do hormônio do crescimento (GH). O hormônio do crescimento é produzido na glândula pituitária anterior, é liberado na corrente sanguínea e estimula o fígado a produzir o IGF-1. O IGF-1 então estimula o crescimento sistêmico do corpo e tem efeitos promotores de crescimento em quase todas as células do corpo, especialmente células do músculo esquelético, cartilagem, ossos, fígado, rim, sistema nervoso, pele, células hematopoiéticas e pulmonares. Além dos efeitos semelhantes aos da insulina, o IGF-1 também pode regular a síntese de DNA celular.

INFLAMASSOMA - Um complexo multiproteico formado no citosol de fagócitos mononucleares, células dendríticas e outros tipos de células que proteoliticamente geram a forma ativa de IL-1 um precursor inativo. A formação do complexo que inclui NLRP3 (um receptor semelhante a NOD de reconhecimento de padrões) caspase-1 é estimulada por uma variedade de produtos microbianos, moléculas associadas a danos celulares e cristais.

INTERLEUCINA - Qualquer elemento de um grande número de citocinas cujo nome contém um sufixo numérico aproximadamente sequencial para a descoberta ou a caracterização molecular (exemplo: interleucina -1). Algumas citocinas foram originalmente nomeadas pelas suas atividades biológicas e não tem uma designação de interleucina.

INTERLEUCINA -1 RA- Produzida por macrófagos agindo em várias células como antagonista competitivo da IL-1.

INTERLEUCINA-1B - É produzida pelos macrófagos, células endoteliais e algumas células epiteliais. Sua ação é observada nas células endoteliais na ativação inflamação e da coagulação, no hipotálamo para indicar sinais de inflamação e febre e no fígado para a síntese de proteínas em fase aguda de inflamação.

INTERLEUCINA -5 - Produzidas por células T CD4+ com diferenciação em perfil TH2 agindo em locais de inflamação nos eosinófilos: ativação, geração aumentada e nas células B auxiliando na proliferação e produção de IgA (*in vitro*).

INTERLEUCINA-8 - Produzida por macrófagos agindo sobre as células NK e linfócitos T para síntese de IFN- γ .

INTERLEUCINA-10 - Produzida por macrófagos e células T regulatórias agindo sobre os mesmos e células dendríticas. Pode ter papel também na inibição da expressão de IL-2, moléculas coestimuladoras e do MHC classe I.

INTERLEUCINA-13 - Produzida por Células T CD4+ com perfil TH2, células NKT, mastócitos agindo nas células B na mudança isotipo IgE, células epiteliais para o aumento da produção de muco; Fibroblastos: aumento da síntese de colágeno; macrófagos na ativação alternativa.

INTERLEUCINA-17 - Produzida por células T agindo em células endoteliais para o aumento da produção de quimiocinas; nos macrófagos aumentando a produção de quimiocinas e citocinas; e nas células epiteliais para produção de GM-CSF e G-CSF.

INTERLEUCINA-23 - Produzida por macrófagos e células dendríticas o sítio de ação é no auxílio da diferenciação e manutenção de linfócitos T com produção de IL-17.

NLRP3 - O NLRP3 (domínio de ligação ao nucleotídeo e domínio de pirina 3 repetido rico em leucina) oligomeriza e se agrupa com ASC (proteína do tipo *speck* associada à apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase) para formar inflamassomas funcionais em resposta a uma ampla faixa de sinais de perigo extracelular, incluindo ATP ou cristais. O inflamassoma NLRP3 é positivamente regulado pelo baixo K⁺ intracelular, pelo aumento das espécies reativas de oxigênio e pela ruptura da membrana dos lisossomas, que são processos afetados durante o inchaço celular.

PADRÃO MOLECULARES ASSOCIADOS A DANOS (DAMP) – Moléculas endógenas que são produzidas por ou liberação de células danificadas e que estão morrendo que se ligam a receptores de reconhecimento padrão e estimulam a resposta imunológica normal. Exemplo: ATP extra-celular .

PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS A PATÓGENOS (PAMP) - Estruturas produzidas por microorganismos, mas não por células de mamíferos (hospedeiras), que são reconhecidos por estimularem o sistema imune natural.Exemplos incluem lipopolissacarídeos bacteriano e o RNA viral de fita dupla.

P2X7r- Os receptores purinérgico P2, que pode ser subdividida em duas famílias: (1) os P2YR acoplados à proteína G (P2Y1-14) e (2) os canais iônicos dependentes de ligante P2XR (P2X1 - 7). Entre os subtipos P2XR, P2X7r ele é particularmente elevado nas células do sistema imune, e seu comportamento é único na exposição repetitiva ou prolongada a altas concentrações de ATP, pode formar um grande poro de membrana permeável a solutos hidrofílicos de massa molecular de até 900 kD. A ativação do P2X7r em células imunes, incluindo células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, tem estado envolvida em várias respostas celulares pró-inflamatórias, como a liberação de espécies reativas de oxigênio, metaloproteinase de matriz-9 e

citocinas (IL-2, IL-6 e IL-18) e via ligação à via do inflamassoma NLRP3 na produção e liberação de IL-1 β madura.

RECEPTORES SEMELHANTES A NOD (NRL) - Trate-se de uma família de proteínas citosólicas de multidomínio que possuem os PAMPs e os DAMPs citoplasmáticos e recrutam outras proteínas para formar complexos de sinalização que promovem a inflamação.

RELAXINA-1 E 3 - A Relaxina-1 é produzida pelo ovário e tem como alvo o sistema reprodutor dos mamíferos para amadurecer o colo do útero, alongar a sínfise púbica e inibir a contração uterina. No sistema cardiovascular, a relaxina atua principalmente ativando a via do óxido nítrico. Outros mecanismos incluem a ativação de NF κ B levando ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e à transcrição das metaloproteinases da matriz. Demonstrou-se que a relaxina relaxa as células musculares lisas vasculares e aumenta a produção de óxido nítrico nas células endoteliais, desempenhando um papel na regulação da função cardiovascular pela dilatação das artérias de resistência sistêmica. A relaxina aumenta a taxa e a força da contração cardíaca. Por meio da regulação positiva do VEGF, a relaxina desempenha um papel fundamental na formação de vasos sanguíneos (angiogênese) durante a gestação, desenvolvimento de tumor ou feridas isquêmicas.

SENSIBILIDADE – É a capacidade que o teste diagnóstico/triagem apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes.

TSLP - Produzido pelo Timo e com ação em células mieloides com indução e liberação de quimiocinas que atraem as células T também monócitos aumentando a diferenciação e maturação das células dendríticas CD11c (+). Auxiliando também as respostas de células T CD4+ com perfil Th2.

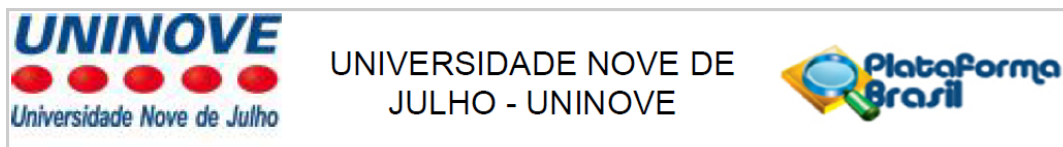
VALOR PREDITIVO POSITIVO - É a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo ser realmente doente.

VALOR PREDITIVO NEGATIVO - É a probabilidade de um indivíduo avaliado ter seu teste normal sem alteração.

VEGF - Produzida por endoteliais e tem ação na angiogênese de tumores e de tecidos.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UNINOVE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório

Pesquisador: ERASMO ASSUMPÇÃO NETO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43189515.0.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.021.627

Data da Relatoria: 13/04/2015

Apresentação do Projeto:

Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório

Objetivo da Pesquisa:

Fazer a análise dos biomarcadores séricos e dos biomarcadores do lavado nasal comparado com a evolução clínica dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O trabalho acarretará mínimos riscos para os pacientes, já que a coleta de material biológico será realizado conforme rotina já estabelecida do Conjunto Hospitalar do Mandaqui com técnica e materiais estéreis, em ambiente hospitalar sempre pelo mesmo profissional. O tratamento clínico/medicamentoso continuará a ser realizado independentemente dos resultados encontrados. O Sigilo do paciente será sempre respeitado.

Benefícios:

Dentre os vários benefícios da pesquisa estão a possibilidade de fazer o diagnóstico e tratamento precoce de possíveis complicações decorrentes da gravidade da infecção pelo vírus sincicial

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

CEP: 01.504-001

E-mail: comitedeetica@uninove.br

Continuação do Parecer: 1.021.627

respiratório.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa adequada, apresentando objetivos que estão de acordo com a metodologia aplicada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão presentes de forma satisfatória

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado para execução.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 13 de Abril de 2015

Assinado por:
Stella Regina Zamuner
(Coordenador)

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

UF: SP

Telefone: (11)3385-9197

Município: SAO PAULO

CEP: 01.504-001

E-mail: comitedeetica@uninove.br

8.2 ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do Conjunto Hospitalar do Mandaqui

CONJUNTO HOSPITALAR DO
MANDAQUI - CHM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório

Pesquisador: ERASMO ASSUMPÇÃO NETO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43189515.0.3001.5551

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.077.316

Data da Relatoria: 27/04/2015

Apresentação do Projeto:

Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório

Apresentação clara e de fácil entendimento

Objetivo da Pesquisa:

Fazer a análise dos biomarcadores séricos e dos biomarcadores do lavado nasal comparado com a evolução clínica dos pacientes.

Exposição objetiva

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O trabalho acarretará mínimos riscos para os pacientes, já que a coleta de material biológico será realizado conforme rotina já estabelecida do Conjunto Hospitalar do Mandaqui com técnica e materiais estéreis, em ambiente hospitalar sempre pelo mesmo profissional. O tratamento clínico/medicamentoso continuará a ser realizado independentemente dos resultados encontrados. O Sigilo do paciente será sempre respeitado.

Benefícios:

Dentre os vários benefícios da pesquisa estão a possibilidade de fazer o diagnóstico e tratamento precoce de possíveis complicações decorrentes da gravidade da infecção pelo vírus sincicial

Endereço: VOLUNTARIOS DA PATRIA 4301 - Prédio 4 - Casa Azul

Bairro: SANTANA

CEP: 02.401-400

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (19)2281-5147

Fax: (19)2281-5179

E-mail: cepchm@gmail.com

CONJUNTO HOSPITALAR DO
MANDAQUI - CHM



Continuação do Parecer: 1.077.316

respiratório.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os termos de apresentação obrigatória estão presentes de forma satisfatória

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem considerações

Recomendações:

Recomenda-se explicação clara as mães das crianças e as mesmas, na execução dos procedimentos.

Maior cuidado nas crianças neonatas do grupo c.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Os membros do colegiado após análise e discussão do Projeto deliberaram por acatar na íntegra o Parecer do relator.

SAO PAULO, 25 de Maio de 2015

Assinado por:

Sergio Makabe

(Coordenador)

Endereço: VOLUNTARIOS DA PATRIA 4301 - Prédio 4 - Casa Azul

Bairro: SANTANA

CEP: 02.401-400

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (19)2281-5147

Fax: (19)2281-5179

E-mail: cepchm@gmail.com

8.3 ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCLE - Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica:

Nome do Voluntário: _____
Endereço: _____
Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____
E-mail: _____

1.Título do Trabalho Experimental: "Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório."

2.Objetivo: Comparar a quantidade de biomarcadores imunológicos séricos com os contidos no lavado nasal de pacientes menores de 2 anos com diagnóstico de infecção pelo vírus sincicial respiratório.

3.Justificativa: Pacientes com altos níveis de biomarcadores pró-inflamatórios e baixos níveis dos anti-inflamatórias, apresentam pior evolução clínica como maior tempo de internação hospitalar e em unidade de terapia intensiva, necessidade de ventilação pulmonar mecânica, etc.

4. Procedimentos da Fase Experimental: As informações abaixo estão sendo fornecidas para a participação do seu filho(a) com seu consentimento voluntário, que tem como objetivo comparar a quantidade de biomarcadores imunológicos séricos(no sangue) com os contidos no lavado nasal de pacientes menores de 2 anos com diagnóstico de infecção pelo vírus sincicial respiratório para que seja possível avaliar de uma maneira não invasiva (sem agulha) alguns exames muito importantes sobre a inflamação causada pela infecção viral.

Se aceitar participar do estudo, seu filho(a) será avaliado durante 1 (um) dia e será submetido aos seguintes procedimentos:

- I. **Avaliação clínica geral:** Serão realizadas perguntas para o senhor(a) sobre a saúde do seu filho(a) sobre a internação atual, nascimento, doenças de repetição e internações anteriores. O tempo pode variar de 20-30 minutos. Outros dados referentes apenas a internação serão coletados diretamente do prontuário hospitalar do seu filho(a).
- II. **Coleta de sangue venoso periférico:** Para avaliar a resposta imunológica causada pela infecção respiratória, será preciso coletar 5 (cinco) mL de sangue de uma veia do braço do seu filho(a). A coleta será realizada com material descartável e por profissional capacitado.
- III. **Coleta de aspirado nasal:** O procedimento é muito semelhante à limpeza nasal que já está sendo realizada para o tratamento do seu filho(a). Será aspirado a secreção presente no nariz do seu filho com o auxílio de 5 (cinco) mL de soro fisiológico 0,9% SEM agulha armazenado em um coletor estéril.

5. Desconforto, Riscos Esperados e Benefícios: O trabalho tem riscos mínimos para seu filho(a). O local da coleta de sangue poderá ficar um pouco roxo e devido a utilização de uma agulha seu filho(a) sentirá um pouco de dor, porém, a coleta do sangue e do lavado nasal serão realizados com técnica e materiais estéreis. Todo o tratamento clínico continuará a ser realizado independentemente dos resultados encontrados.

O trabalho apresenta como benefício a possibilidade de identificar novos alvos diagnósticos e terapêuticos para evitar complicações decorrentes da gravidade da infecção pelo vírus sincicial respiratório utilizando uma técnica não invasiva (que não utiliza agulhas).

6. Métodos Alternativos Existentes: A pesquisa dos biomarcadores pode ser realizada em outros materiais biológicos como lavado bronco-alveolar, suor, urina dentre outros.

7. Retirada do Consentimento: Você é livre para retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento da pesquisa. A sua participação é exclusivamente voluntária e a recusa em participar não acarretará nenhuma penalidade ou perda de benefício ou mudança do tratamento.

"Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório." 1

Aprovação CEP-UNINOVE: 1.021.627 em 13/04/2015 e Aprovação CEP-Mandaqui: 1.077.316 em 25/05/2015

8. Garantia do Sigilo: Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados laboratoriais da pesquisa permanecerão confidenciais e serão enviados para você. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado para análise sem a sua permissão e você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada e outra será fornecida a você.

9. Garantia de ressarcimento compensação material, exclusivamente de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação. Res. Nº 466/12 – Item II.21: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional já que toda a coleta de material será realizada durante a internação hospitalar do paciente, não ocorrendo gastos com tempo, transporte e/ou alimentação.

10. Local da Pesquisa: A pesquisa será desenvolvida no laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício da Universidade Nove de Julho – UNINOVE e no setor pediátrico do Conjunto Hospitalar do Mandaqui.

11. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, com “munus público”, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões ético (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS nº 466/12). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos.

Endereço do Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – 3º subsolo - Liberdade – São Paulo – SP
CEP. 01504-001 Fone: 3385-9197

comitedeetica@uninove.br

12. Nome Completo e telefones dos Pesquisadores (Orientador e Aluno) para Contato: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira - (011) 3385-9001, Prof. Erasmo Assumpção Neto - (011) 3385-9001.

13. Eventuais intercorrências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.

14. Consentimento Pós-Informação:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmando que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos somente neste estudo no meio científico.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

ATENÇÃO: FAZER O DOCUMENTO EM 2 (DUAS) VIAS.

8.4 ANEXO 4 – Folha de escores

ESCORES DE DESCONFORTO RESPIRATÓRIO

Escore - 01	0 Pontos	1 Ponto	2 Pontos	3 Pontos
Freq. Respiratória	< 30 irpm	31 – 45 irpm	46 – 60 irpm	> 60 irpm
Desconf. Resp.	Ausência	Retração Intercostal	Retração de Fúrcula	Batim asa de nariz
Ausulta Pulmonar	Normal	Sibilo Expiratório	Sibilo Inspiratório e Expiratório	Diminuição ou Ausência de MV
Estado Geral	Normal	Alimentação difícil	Irritabilidade	Letargia ou Coma
Coloração pele	Normal	Palidez	Cianose Periférica	Cianose Generalizada
Saturação O2	>95%	93 – 95%	<93%	Falência Respiratória

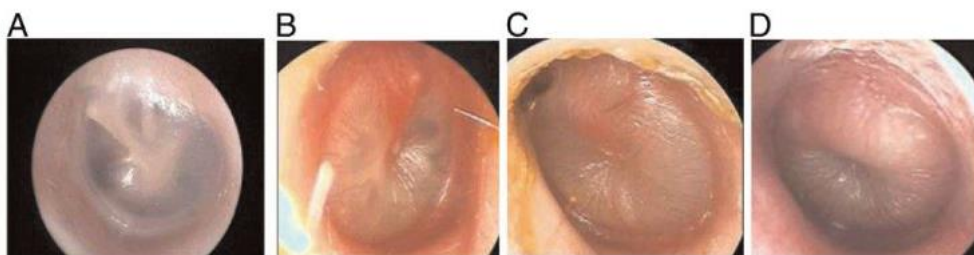
Tabela 1 - Escore de Gravidade (adaptado Wang et al, 1992)

Escore - 02	0 Pontos	1 Ponto	2 Pontos	3 Pontos
Freq. Respiratória	< 30 irpm	31 – 45 irpm	46 – 60 irpm	> 60 irpm
Tiragem	Ausência	Subdiafragmática ou Intercostal	Batimento de asa de nariz SEM fúrcula	Batimento de asa de nariz COM fúrcula
Sibilo	Não	Final expiração	Durante toda expiração	Expiratório e Inspiratório
Freq. Cardíaca	<120 bpm	>120 bpm	--/--	--/--
Cianose	Sim	Não	--/--	--/--
Murmúrio Vesicular	Normal	Regular; Simétrico	Diminuído; Simétrico	Silencioso; S/ sibilos

Tabela 2-Scale Wood-Downes-Ferrés (bronquiolite)

Escore - 03	0 Pontos	1 Ponto	2 Pontos	3 Pontos
Murmúrio Vesicular	Normal	Diminuído nas bases	Diminuído globalmente	Silencioso
Músculo escaleno	Ausente	--/--	Presente	--/--
Sibilo	Não	Final expiração	Expiratório e Inspiratório	Murmúrio Vesicular diminuído globalmente
Fúrcula	Não	--/--	Sim	--/--
Saturação O2	>94%	92 – 94%	<92%	--/--

Tabela 3 - Escala PRAM (Pediatric Respiratory Assessment Measure)
CLASSIFICAÇÃO OMA



“Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório.”

Aprovação CEP-UNINOVE: 1.021.627 em 13/04/2015 e Aprovação CEP-Mandaqui: 1.077.316 em 27/04/2015

8.5 ANEXO 5 – Protocolo laboratorial



Protocolo Laboratorial – LABPEI - BQLT

1. Processamento do Aspirado nasal que consistirá em:
 - a. Pegar o material puro (se possível pegar com muco) **SEM CENTRIFUGAR** e armazenar em **2** criotubos com 500µl/cada e colocar no **NITROGÊNIO LÍQUIDO**
 - b. Centrifugação em 1.500 rpm, 4°C por 10 minutos sem break
 - c. Retirar o sobrenadante e alicotar em **3** eppendorfs e colocar no freezer -80°C
 - d. Ressuspender o palet de células com 1ml de PBS 1%
 - e. Fazer a contagem na câmara de Newbauer
 - f. Fazer 6 lâminas (5 silanizadas e 1 normal) colocando 10.000 células em cada poço da citospin e centrifugar 6.000 rpm por 6 min
2. Processamento do tubo de EDTA:
 - a. Fazer hemograma
 - b. Centrifugação em 1.500 rpm, 4°C por 10 minutos sem break
 - c. Retirar o sobrenadante e alicotar em **3** eppendorfs e colocar no freezer -80°C
 - d. Retirar o buffy coat e alicotar em **1** eppendorf com 100µL de RNA later e colocar no freezer -80°C
3. Processamento do tubo de heparina sódica:
 - a. Diluir o sangue na proporção 1:1 com PBS 1x estéril.
 - b. Colocar o sangue diluído em um tubo falcon de 50 mL contendo ficoll hypaque na proporção 1(FH):3(sg)
 - c. Centrifugar 2.200 rpm por 20 minutos com break de 3 minutos.
 - d. Retirar o anel de PBMC e transferir para um tubo falcon 15mL que já contém 1 ml de SF 0,9% estéril
 - e. Ajustar o volume para 10 mL e centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos.
 - f. Retirar o sobrenadante por inversão e descolar o palet de células.
 - g. Ressuspender em 5 mL de SF 0,9% estéril e centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos.
 - h. Retirar o sobrenadante por inversão e descolar o palet de células.
 - i. Ressuspender em 1 mL de RPMI 1640+SFB+Gentamicina e retirar 20 µL e contar na câmara de Newbauer.
 - j. Após a contagem celular, centrifugar as células a 1.500 rpm por 10 minutos.
 - k. Retirar o sobrenadante e congelar as células em solução de 1 ml SFB+DMSO 10%
 - l. **ATENÇÃO:** Congelar no máximo 1×10^7 células por criotubo contendo 1mL da solução SFB+DMSO 10%

8.6 ANEXO 6 – Carta de autorização da Instituição co-participante



CARTA DE AUTORIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE

São Paulo, 03 de Fevereiro de 2015.

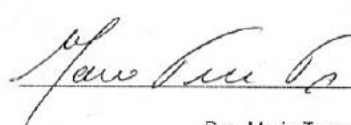
A Gerência de Pediatria do Conjunto Hospitalar do Mandaqui.

Prezada Senhora Dra. Maria Teresa Torgi Alves.

Eu, Erasmo Assumpção Neto, CPF 342.336.068-27, aluno regularmente matriculado no Mestrado em Medicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, venho solicitar seu registro de ciência quanto à submissão ao Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, do Projeto "Biomarcadores imunológicos séricos e nasais na infecção pediátrica pelo vírus sincicial respiratório", registrado na Plataforma Brasil que conta com a possibilidade do desenvolvimento da pesquisa nessa instituição, a depender da aprovação do Comitê de Ética da instituição proponente.

Agradecendo desde já a sua atenção e colaboração, uma vez que sem ela a deflagração do processo estaria prejudicada, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos que se façam necessários.

Atenciosamente,


Dr.ª Maria Teresa Torgi Alves
CPF: 648.267.118-34
CRM: 22.837
Gerente de Pediatria

Dra. Maria Teresa Torgi Alves

Gerente da Pediatria do CHM



Prof. Erasmo Assumpção Neto

Mestrando



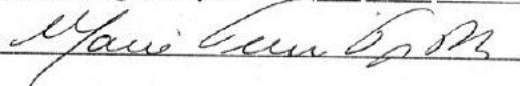
Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Orientador do Mestrado

PRONUNCIAMENTO DA GERÊNCIA DE PEDIATRIA DO CONJUNTO HOSPITALAR DO MANDAQUI

☒ ACEITE ; ☐ NEGAÇÃO. DATA 03/02/2015.

Assinatura e Carimbo



Dr.ª Maria Teresa Torgi Alves
CPF: 648.267.118-34
CRM: 22.837
Gerente de Pediatria

8.7 ANEXO 7 – ARTIGO PUBLICADO



... Published ahead of Print

Dendritic Cells Are Involved in the Effects of Exercise in a Model of Asthma

BreAnne MacKenzie¹, Adilson Santos Andrade-Sousa¹, Manoel Carneiro Oliveira-Junior¹,
Erasmio Assumpção-Neto¹, Maysa Brandão Alves-Rangel¹, Adriano Silva Renno¹,
Alana Santos-Dias¹, Sanja Cicko², Melanie Grimm², Tobias Müller², Ana Paula Ligeiro
Oliveira¹, Milton Arruda Martins³, Marco Idzko², and Rodolfo Paula Vieira¹

¹Nove de Julho University (UNINOVE), Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI), Sao Paulo, Brazil; ²University Hospital Freigurg, COPD and Asthma Research Group, Freiburg, Germany; ³University of Sao Paulo (USP), School of Medicine, Department of Clinical Medicine (LIM 20), Sao Paulo, Brazil

Accepted for Publication: 4 March 2016

Medicine & Science in Sports & Exercise® **Published ahead of Print** contains articles in unedited manuscript form that have been peer reviewed and accepted for publication. This manuscript will undergo copyediting, page composition, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered that could affect the content.

Copyright © 2016 American College of Sports Medicine

Dendritic Cells Are Involved in the Effects of Exercise in a Model of Asthma

BreAnne MacKenzie^{1*}, Adilson Santos Andrade-Sousa^{1*}, Manoel Carneiro Oliveira-Junior^{1*}, Erasmo Assumpção-Neto¹, Maysa Brandão Alves-Rangel¹, Adriano Silva Renno¹, Alana Santos-Dias¹, Sanja Cicko², Melanie Grimm², Tobias Müller², Ana Paula Ligeiro Oliveira¹, Milton Arruda Martins³, Marco Idzko², Rodolfo Paula Vieira¹

¹Nove de Julho University (UNINOVE), Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI), Sao Paulo, Brazil; ²University Hospital Freigurg, COPD and Asthma Research Group, Freiburg, Germany; ³University of Sao Paulo (USP), School of Medicine, Department of Clinical Medicine (LIM 20), Sao Paulo, Brazil

Running title: Exercise modulates immune response in asthma.

* BM, ASAS and MCOJ and have equally contributed to this study.

Corresponding author:

Rodolfo Paula Vieira, PhD
Nove de Julho University (UNINOVE)
Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI) Rua Vergueiro 235/249, São Paulo – SP, Brazil, 01504-001
rodrelena@yahoo.com.br
Phone/Fax: +55 11 3385-9001

This study was supported by a research grant from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) number 2012/15165-2 and 2015/50079-8 and by a research grant from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) 11-7. Results of this study do not constitute endorsement by the ACSM.

Conflict of interest statement

All authors declare no conflict of interest related to this study.

Abstract

Introduction: Investigate the effects of aerobic exercise (AE) on both the maturation of dendritic cells (DCs) and the activation of lymphocytes in a mouse model of chronic allergic airway inflammation. **Methods:** C57Bl/6 mice distributed into Control, Exercise, OVA and OVA+Exercise groups were submitted to OVA sensitization and challenge. Treadmill training was performed for 4 weeks, and mice were assessed for classical features of chronic allergic airway inflammation, as well as dendritic cell activation and T lymphocyte response. **Results:** AE reduced OVA-induced eosinophilic inflammation as observed in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) ($p<0.001$), airway walls ($p<0.001$) and also reduced collagen deposition ($p<0.001$). AE also reduced BALF cytokines (IL-4; $p<0.001$), (IL-5; $p<0.01$), (IL-6; $p<0.001$), (IL13; $p<0.01$) and (TNF- α ; $p<0.01$). Cells derived from mediastinal lymphnodes (MLN) of AE animals that were re-stimulated with ovalbumin, produced less IL-4; ($p<0.01$), IL-5; ($p<0.01$) and IL-13; ($p<0.001$). In addition, AE reduced both DC activation, as demonstrated by reduced release of IL-6 ($p<0.001$), CXCL1/KC ($p<0.01$), IL-12p70 ($p<0.01$) and TNF- α ($p<0.05$) and DC maturation, as demonstrated by lower MCH-II expression ($p<0.001$). **Conclusion:** AE attenuated dendritic cell and lymphocyte activation and maturation, which contributed to reduced airway inflammation and remodeling in the OVA model of chronic allergic airway inflammation.

Key words: asthma, airway inflammation, exercise immunology, cytokines, dendritic cells, lymphocytes.

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory, heterogeneous airway disease affecting millions of people around the world (7, 19). Asthma is characterized by partially reversible airflow limitation, hyperresponsiveness (AHR), wheezing, cough, and airway remodeling of variable severity (7, 13, 19). Using ovalbumin (OVA) to sensitive mice, this study models allergic asthma, which is characterized primarily by a T-helper type 2 lymphocyte (Th2) mediated-pathology. The pathophysiology of the murine ovalbumin (OVA) model is more similar to allergic asthma in humans, which reproduces several allergic asthma phenotypes, such as eosinophilic airway inflammation, remodeling and hyperresponsiveness, as well as increased Th2 cytokines and IgE levels, and is distinct from exercise-induced asthma (EIA) or exercise-induced bronchoconstriction (EIB) both of which are not primarily Th2-mediated.

The mechanisms underlying the beneficial effects of AE presented in clinical studies, such as improved exercise capacity and quality of life, reduced bronchospasm, reduced anxiety and depression, attenuated airway AHR, decreased use of corticosteroids, and reduced eosinophilic inflammation (4, 14, 15, 21) remain unclear. Murine models of allergic asthma have suggested some mechanisms by which moderate AE may be beneficial to allergic asthma patients. For example, in mouse models, low and moderate intensity AE was found to inhibit redox imbalance, attenuate NF- κ B activation, and increase pulmonary T regulatory cells and corticosteroid receptors (1, 8, 12, 16–18, 20, 22–24, 26, 27).

In humans, myeloid dendritic cells (mDCs) have been implicated in allergic asthma as they trigger and maintain asthmatic airway inflammation (6, 9). mDCs are considered pro-inflammatory cells as they prime naïve T cells in the lung and also in the lymph nodes, which results in Th2 differentiation and subsequent Th2 cytokine production, a key feature of asthma

(6, 9). In order to prime T cells, immature DCs (iDCs) must develop into mature myeloid DCs (mDCs), which are characterized by the expression of surface markers such as CD40, CD80, CD83, CD86 and the major histocompatibility class II (MHC-II) (6, 9). Thus mDCs are essential in the very early phase of asthma, and also play a key role in sustaining unresolved Th2-mediated inflammation (6, 9).

Whether AE affects the maturation and activation of DCs and activation of lymphocytes, has neither been investigated in humans with allergic asthma nor in murine models. Given the importance of DCs in mediating the allergic asthma phenotype in humans (6, 9) and in mouse models of allergic asthma (9), this study aimed to evaluate the effects of moderate AE on DC maturation and activation and subsequent T-cell activation in the murine ovalbumin model of allergic asthma.

Materials and Methods

All experiments were approved by the local ethical committee of Freiburg and also by the ethical committee of Nove de Julho University (AN004.2014) and were carried out according to the Helsinki convention for the use and care of animals published in 2013.

Animals and experimental groups

Male C57Bl/6 mice (6-8 weeks old) were bred at the animal facility of the University Hospital Freiburg and also in the animal facility of Nove de Julho University under specific pathogen free conditions.

Animals were divided into four experimental groups as follows: Naïve (Control; non-exercised and non-sensitized; n=20), Exercise (Exe; exercised and nonsensitized; n=20),

ovalbumin (OVA) (OVA; non-exercised and ovalbumin sensitized; n=20) and OVA+Exercise (OVA+Exe; ovalbumin sensitized + exercised; n=20).

Induction of chronic allergic airway inflammation

In total, the experiment lasted 58 days, with the exercise protocol beginning on day 28 and ovalbumin sensitization on day 0. Briefly, animals were sensitized with single intra-peritoneal injections (20ug/mouse) of ovalbumin on days 0, 14, 28 and 42. In addition, mice were challenged with aerosolized ovalbumin solution (1%) 3x/week, 30 minutes/session, beginning on day 21 and ending on day 55 (5 weeks), as previously described (22).

Aerobic treadmill test and training

All mice were adapted to treadmill training for 3 days (days 24-26), followed by a physical test on the fourth day (days 27) as previously described (22). Beginning on day 28, Exe and OVA+Exe groups were trained on a treadmill for mice at low intensity (60% of maximal velocity reached in the initial physical test) for one hour, 5x/week for four weeks (days 28-56). (22). A physical test was repeated on day 57, testing for maximal velocity, and animals were euthanized on day 58.

Analysis of airway inflammation

Airway inflammation was assessed through bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and also by quantitative histological analysis. Under anesthesia (10mg/kg ketamine and 100mg/kg xylazine), animals were tracheotomised, and a cannula was inserted into the lungs. Lungs were washed with 3.0mL of PBS. Total number of cells in BALF were counted using a hemocytometer and differential evaluations were performed by FACS (Accuri C6, BD Biosciences) as previously described (25). Briefly, after counting and washing, BALF cells were

stained for 30 minutes with anti-I-Ad/I-Ed FITC (macrophages/DC), anti-CCR3 (eosinophils), anti-CD3 and anti-CD19 cy-chrome/PE-Cy5 (lymphocytes) and anti-CD11c APC (macrophages/DCs) in PBS (25). In addition, airway inflammation was also assessed through quantitative histomorphometric analysis as previously described (24). Briefly, 5µm thickness lung slices were stained with hematoxylin and eosin for analysis of lung structure and eosinophils count in the peribronchial space (5 complete airways per mouse) (24). The peribronchial space corresponded to the area between the epithelial basement membrane (outer boundary of the bronchial epithelium) and the airway adventitia (corresponding to the beginning of the lung parenchyma). Thus, after measuring the peribronchial area using the Image ProPlus version 4.5 (Media Cybernetics, MD, USA), the number of eosinophils into this area were counted using hematological criteria (24). The results were expressed as number of eosinophils per square millimeter of peribronchial area (24).

Analysis of airway remodeling

Five µm lung slides were stained with picrosirius red staining kit (Abcam ab150681) for evaluation of collagen deposition in the airway walls, and a quantitative histomorphometric method was applied as previously described (24). Briefly, the peribronchial space corresponded to the area between the epithelial basement membrane (outer boundary of the bronchial epithelium) and the airway adventitia (corresponding to the beginning of the lung parenchyma). Thus, after measuring the peribronchial area using the Image ProPlus version 4.5 (Media Cybernetics, MD, USA), the red stained area, which correspond to collagen fibers, were measured using the same software. The results were expressed as percentage of collagen fibers related to the total peribronchial area (24).

Generation and culture of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs)

Bone marrow cells were collected from bone marrow lavage of naïve and exercised animals, as previously described [4]. Bone marrow lavages were centrifuged for 5 minutes, 4°C at 1500rpm and cell pellets were re-suspended and cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 1% gentamicin and recombinant murine GM-CSF (200UI/mL) for 8 days. On the 9th day of culture, cells were pulsed with ovalbumin (100µg/mL) and the supernatant was collected for cytokine measurement (as an indication of DC activation) and the cells used for analysis of BMDCs maturation by FACS analysis [4].

Activation of Lymphocytes from Mediastinal Lymph Nodes (MLN)

MLNs were collected from all animals from all experimental groups and passed through a 70µm cell strainer followed by 40µm in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1% gentamicin in a sterile environment. Cells were counted and resuspended in the medium described above and then placed in 96 well plates.

Th1, Th2 and Anti-inflammatory Cytokines Analysis

Cytokines were analyzed by ELISA R&D Systems DuoSet ELISA kits (IFN-γ DY458; TNF-α kit DY410; IL-6 kit DY406; IL-12p70 kit DY419; IL-4 kit code DY404; IL-5 kit code DY405; IL-13 kit code DY413 and IL-10 kit code DY417) according to the manufacturer's recommendations in the supernatant of BALF, DC supernatant, and also in the supernatant of re-stimulated mediastinal lymphnodes (MLN) as previously described (24).

Statistical Analysis

The Sigma Stat 3.5 software was used for statistical analysis. The Graph Pad Prism 5.0 software was used to build the graphs. Normality analysis revealed parametric data that were expressed as means \pm SD. Comparisons between all groups were carried out by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test. Values were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Aerobic exercise reduces inflammatory cells in BALF

In order to verify robust asthmatic response due to OVA injury, and to assess the extent by which moderate AE attenuated OVA injury, a differential analysis of cells present in the bronchial alveolar lavage fluid (BALF) was performed. Total cell number (Figure 1A), eosinophils (Figure 1B), neutrophils (Figure 1C), lymphocytes (Figure 1D), and macrophages (Figure 1E), were increased significantly in BALF fluid of OVA-treated mice suggesting considerably increased inflammation in OVA-treated mouse lungs. Exercise alone did not increase the number of inflammatory cells. The presence of inflammatory cells in the BALF of OVA-treated mice that performed moderate intensity exercise (AE) was significantly decreased compared to OVAtreated sedentary mice.

Aerobic exercise positively modulates the pulmonary cytokines levels

To further assess inflammatory levels, inflammatory cytokines were measured (Figure 2). In concordance with inflammatory cell counts (Figure 1), an increase in pro-inflammatory cytokines IL-4 (Figure 2A), IL-5 (Figure 2B), IL-6 (Figure 2C), IL-13 (Figure 2F) and TNF- α (Figure 2G) was observed in OVA-treated mice. Pro-inflammatory cytokines were attenuated in OVA mice performing AE, and slightly reduced in exercise only groups. Anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 2C) was increased in exercise only and OVA+Exe groups suggesting that moderate AE significantly increased IL-10 in the presence or absence of OVA treatment. AE slightly increased Th1 cytokine IL-12p70. IL-12p70 was decreased in the OVA-only group, indicating a primarily Th2 response in this model, and remained at the same level as the non-treated group in the OVA+Exe group, indicating that exercise may result in a more balanced Th1/Th2 response (Figure 2E).

Aerobic exercise reduces chronic allergic airway inflammation and remodeling

In order to assess the number of eosinophils present in the conducting airways, quantitative histological analyses were performed on hematoxylin and eosin stained sections, and eosinophils were counted (Figure 3A-D). The number of eosinophils was unchanged in the exercise only group and increased to approximately 130/mm² in the sedentary OVA group. Moderate intensity AE reduced eosinophil counts to approximately 50/mm² (Figure 3A), matching observations of eosinophils in the BALF fluid (Figure 1B).

As in asthma, the OVA model also leads to structural remodeling of the airways. Picrosirius staining indicated no change in exercise only mice, and an increase in collagen fibers in OVA mice compared to control (Figure 3F). Exercised OVA mouse airways underwent significantly less remodeling (Figure 3F). Results were quantified as the percent of airway

collagen (Figure 3F). In summary, these data demonstrate that moderate intensity AE decreases airway remodeling due to Th2 inflammation in a model of OVA.

Aerobic exercise inhibits T lymphocytes activation

Immature dendritic cells that sense and collect antigen, like OVA as used in the present study, in the lung, will then continue on to the mediastinal lymphnodes (MLN) where they will present the OVA antigen to naïve T-cells. Naïve T-cells that have become Th2 cells are robust producers of IL-4, IL-5 and IL-13. Therefore, measuring these cytokines in the MLN also serves as an measurement of the Th2 cell population activation (24). In exercise only mice, the cytokine levels were similar to those of the control, while in OVA treated mice, Th2 cytokines were increased. As expected, reduced levels of Th2 cytokines were observed in exercised OVA mice (Figure 4A, B, C). IFN- γ is produced predominantly by natural killer (NK), natural killer T (NKT) cells, and also by cytotoxic Th1 cells. IFN- γ was not significantly regulated between groups in this model (Figure 4D).

Aerobic exercise inhibits dendritic cells activation and maturation

Next, a model of dendritic cell maturation using OVA stimulation of dendritic cells isolated from bone marrow lavages (BMDCs) derived from either sedentary or exercised animals was performed (24). On the ninth day of culture, cells were pulsed with ovalbumin (100 μ g/mL) and the supernatant was collected for cytokine measurement using ELISA (Figure 5) and also for FACs analyses for surface markers of dendritic cell maturation (Figure 5). Results are expressed as the level of cytokines detected in cell free medium versus the level of cytokines detected in the cell free medium of BMDCs of sedentary animals (Naïve/Medium) or exercised-only animals

(Exe/Medium). In addition, BMDCs derived from non-stimulated sedentary mice were compared to OVA-stimulated BMDCs isolated from sedentary mice (Naïve/OVA). In addition, cytokine levels of non-stimulated BMDCs derived from exercised mice were compared to those of BMDCs from exercised mice stimulated with OVA (Exe/OVA). In summary, BMDCs derived from exercised only mice were more resistant to OVA-induced cytokines IL-6, CXCL1/KC, IL-12p70, and TNF- α (Figures 5A-D).

FACS analyses revealed higher expression of mature dendritic cell marker MHC-II in OVA-stimulated BMDCs derived from sedentary animals than in OVA-stimulated BMDCs derived from exercised animals (Figure 6A). Other markers for mature dendritic cells: CD80 (Figure 6B), CD83 (Figure 6C), and CD86 (Figure 6D) were only slightly reduced in OVA-stimulated BMDCs derived from exercised animals. These results suggested that BMDCs derived from exercised animals might be less mature than BMDCs derived from sedentary animals. Thus the attenuated Th2 response observed in the OVA+Exe groups may be partly due to exercise's stifling effect on dendritic cell maturation. Figure 6E and 6F are representative FACS histogram from CD80 and CD83 expression, respectively.

Discussion

Allergic asthma is a disease characterized by a prodigious Th2 response, which is instigated by mDCs. Although low and moderate AE has been shown to attenuate the Th2 response in mouse models of allergic asthma (1, 8, 12, 16–18, 20, 22–24, 26, 27), whether moderate AE affects the maturation and activation of DCs and the subsequent lymphocyte response has not been studied. In this study, OVA-sensitized mice ran on a treadmill at 60% of

their maximal capacity (an intensity similar to jogging or light running) for 5 days a week, 60min a day, for 5 weeks, and showed a decreased Th2 response. While these results suggest that moderate AE may attenuate the Th2 activation in allergic asthmatics, ovalbumin model of chronic allergic airway inflammation is not part of the true pathology of allergic asthma, therefore these results require cautious interpretation.

DCs derive from hematopoietic stem cells in the bone marrow and home to sites of pathogen invasion. Antigen acquisition and processing by DCs stimulates their maturation, which is partly characterized by MHCII expression. Next, mDCs migrate to mediastinal lymph nodes (MLNs) to educate naïve T-cells. Thus mDCs influence whether the lymphocyte response to a pathogen is primarily Th1 or Th2 mediated. In this study, OVA-treatment of both sedentary and exercised mice resulted in an overall increase in lymphocyte infiltration in the lung (Figure 1). However, their respective cytokine profiles were significantly different (Figure 2). Reduced Th2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13) in the OVA-Exe animals suggested incomplete maturation of dendritic cells in exercised mice, which likely contributed to the attenuated lymphocyte accumulation in OVA+Exe animals. Likewise, increased IL-6 production in OVA mice indicated that in the absence of exercise, dendritic cells illicit a primarily Th2 response (2). Furthermore, the reduction of the Th1 cytokine IL-12p70 in OVA sedentary mice also indicated a major recruitment of Th2 cells in this model. In contrast, the maintenance of IL-12p70 production in OVA+Exe mice suggested that moderate AE may result in a more balanced Th1/Th2 response to OVA. Since allergic asthma in humans is characterized primarily by a robust Th2 response, these results along with other allergic asthma model animal study results (1, 8, 12, 16–18, 20, 22–24, 26, 27), suggest that moderate AE may attenuate an allergic asthmatic's

Th2 response to allergens, however clinical studies exposing allergic asthmatics to a regimen of moderate intensity AE are needed.

In both exercise and OVA+Exe mice, anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased. *In vitro*, IL-10 inhibits both cytokine production and antigen-presenting function by inhibiting IL-12 production as well as the expression of MHCII, the co-stimulatory molecules CD80, CD86, and the DC marker CD83 (11). Interestingly, IL-10 reduced MHCII expression following activation of monocytes with LPS (28). Exposure to increased levels of IL-10 following exercise may explain why MHCII expression was strongly reduced in activated dendritic cells derived from exercised mice and significantly but not strongly for the other markers of mDCs maturation such as CD80, CD83, and CD86 (Figure 6).

AE has also been shown to increase intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (3). cAMP signals not only via protein kinase A (PKA), but also activates exchange protein activated by cAMP (Epac), a second major cAMP effector. In the context of dendritic cell maturation, one study showed that cAMP-activated Epac blocked MHCII expression by dendritic cells (5). Moreover, cAMP and cAMP-elevating agents have been demonstrated to repress antigen presentation by LPS-stimulated BMDCs (10). Taken together, increased cAMP due to AE may be another potential mechanism by which the expression of MHCII was reduced by BMDCs harvested from exercised mice and stimulated *in vitro* with OVA. However, it remains unclear why co-stimulatory molecules CD80, CD86, and the DC marker CD83 expression remain elevated in exercised animals. In the future, co-cultures of dendritic cells and lymphocytes harvested from this model may provide further insight into the mechanisms involved.

In summary, moderate AE led to decreased maturation of DCs indicated by a reduction of MHCII, CD80, CD83 and CD86 expression in this model (Figure 6) which likely contributed to decreased Th2 differentiation and activation, resulting in the blunted pro-inflammatory cytokine response observed in OVA+Exe mice (Figure 2). These results further support the anti-inflammatory effects of moderate intensity AE in ovalbumin model of chronic allergic airway inflammation, and provide evidence that AE may stifle dendritic cell maturation and activation and T lymphocyte activation thereby promoting a more balanced immune response.

Acknowledgements: Rodolfo Paula Vieira held a Post-doctoral fellowship from European Respiratory Society (ERS) co-funded by European Union (EU) and Marie Curie Actions (MC 1504-2010). ASAS holds a PhD fellowship from CAPES. MCOJ holds a PhD fellowship from Sao Paulo Research Foundation (FAPES). BM holds a postdoctoral fellowship from Sao Paulo Research Foundation (FAPES). This study was supported by a research grant from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP)

number 2012/15165-2 and 2015/50079-8 and by a research grant from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) 11-7. Results of this study do not constitute endorsement by the ACSM.

References

1. Brüggemann TR, Ávila LCM, Fortkamp B, et al. Effects of Swimming on the Inflammatory and Redox Response in a Model of Allergic Asthma. [Internet]. *Int. J. Sports Med.* 2015;[cited 2015 Nov 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25958938>
2. Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB. IL-6 Production by Pulmonary Dendritic Cells Impedes Th1 Immune Responses [Internet]. *J. Immunol.* 2003;170(9):4457–64.[cited 2015 Dec 29] Available from: <http://www.jimmunol.org/content/170/9/4457.full>
3. Dunbar CC, Kalinski MI. Cardiac intracellular regulation: exercise effects on the cAMP system and A-kinase. [Internet]. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1994;26(12):1459–65.[cited 2015 Dec 29] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7869879>
4. França-Pinto A, Mendes FAR, de Carvalho-Pinto RM, et al. Aerobic training decreases bronchial hyperresponsiveness and systemic inflammation in patients with moderate or severe asthma: a randomised controlled trial. [Internet]. *Thorax* 2015;70(8):732–9.[cited 2015 Jun 15] Available from: <http://thorax.bmj.com/content/70/8/732.long>
5. Garay J, D'Angelo JA, Park Y, et al. Crosstalk between PKA and Epac regulates the phenotypic maturation and function of human dendritic cells. [Internet]. *J. Immunol.* 2010;185(6):3227–38.[cited 2015 Dec 29] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3100203&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

6. Gauvreau GM, El-Gammal AI, O'Byrne PM. Allergen-induced airway responses. [Internet]. *Eur. Respir. J.* 2015;46(3):819–31.[cited 2015 Dec 4] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26206871>
7. GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention | Documents / Resources | GINA [Internet][date unknown];[cited 2015 Dec 4] Available from: <http://www.ginasthma.org/documents/4>
8. Hewitt M, Estell K, Davis IC, Schwiebert LM. Repeated bouts of moderate intensity aerobic exercise reduce airway reactivity in a murine asthma model. [Internet]. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2010;42(2):243–9.[cited 2015 Sep 14] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2822985&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
9. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. [Internet]. *Nat. Med.* 2007;13(8):913–9.[cited 2015 Nov 25] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17632526>
10. Kambayashi T, Wallin RPA, Ljunggren H-G. cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function [Internet]. *J. Leukoc. Biol.* 2001;70(6):903–10.[cited 2015 Dec 29] Available from: <http://www.jleukbio.org/content/70/6/903.full>
11. Knödler A, Schmidt SM, Bringmann A, et al. Post-transcriptional regulation of adapter molecules by IL-10 inhibits TLR-mediated activation of antigenpresenting cells. [Internet]. *Leukemia* 2009;23(3):535–44.[cited 2015 Dec 15] Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.301>

12. Lowder T, Dugger K, Deshane J, Estell K, Schwiebert LM. Repeated bouts of aerobic exercise enhance regulatory T cell responses in a murine asthma model. [Internet]. *Brain. Behav. Immun.* 2010;24(1):153–9.[cited 2015 Sep 14] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2787986&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Maarsingh H, Dekkers BGJ, Zuidhof AB, et al. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. [Internet]. *Eur. Respir. J.* 2011;38(2):318–28.[cited 2015 Dec 2] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21310883>
14. Mendes FAR, Almeida FM, Cukier A, et al. Effects of aerobic training on airway inflammation in asthmatic patients. [Internet]. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2011;43(2):197–203.[cited 2015 Aug 3] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581719>
15. Moreira A, Delgado L, Haahtela T, et al. Physical training does not increase allergic inflammation in asthmatic children. [Internet]. *Eur. Respir. J.* 2008;32(6):1570–5.[cited 2015 Dec 4] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684843>
16. Olivo CR, Vieira RP, Arantes-Costa FM, Perini A, Martins MA, Carvalho CRF. Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs. [Internet]. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2012;182(23):81–7.[cited 2015 Dec 4] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22633937>
17. Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. [Internet]. *J. Immunol.* 2004;172(7):4520–6.[cited 2015 Jul 31] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2892102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

18. Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Schwiebert LM. RU486 blocks the antiinflammatory effects of exercise in a murine model of allergen-induced pulmonary inflammation. [Internet]. *Brain. Behav. Immun.* 2005;19(5):413–22.[cited 2015 Dec 4] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2891236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Reddel HK, Bateman ED, Becker A, et al. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. [Internet]. *Eur. Respir. J.* 2015;[cited 2015 Jul 26] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26206872>
20. Silva ACD, Vieira RP, Nisiyama M, et al. Exercise inhibits allergic lung inflammation. [Internet]. *Int. J. Sports Med.* 2012;33(5):402–9.[cited 2015 Dec 4] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22510803>
21. Silva D, Moreira A. The role of sports and exercise in allergic disease: drawbacks and benefits. [Internet]. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2015;1–11.[cited 2015 Aug 3] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26099040>
22. Silva RA, Vieira RP, Duarte ACS, et al. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. [Internet]. *Eur. Respir. J.* 2010;35(5):994–1002.[cited 2015 Jul 31] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19897558>
23. Vieira RP, de Andrade VF, Duarte ACS, et al. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. [Internet]. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008;295(4):L670–9.[cited 2015 Jul 31] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757522>

24. Vieira RP, Claudino RC, Duarte ACS, et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. [Internet]. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007;176(9):871–7.[cited 2015 Aug 3] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690332>
25. Vieira RP, Müller T, Grimm M, et al. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. [Internet]. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;184(2):215– 23.[cited 2015 Dec 4] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512170>
26. Vieira RP, Silva RA, Oliveira-Junior MC, et al. Exercise deactivates leukocytes in asthma. [Internet]. *Int. J. Sports Med.* 2014;35(7):629–35.[cited 2015 Jul 31] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24258470>
27. Vieira RP, Toledo AC de, Ferreira SC, et al. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. [Internet]. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011;175(3):383–9.[cited 2015 Jul 31] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21236366>
28. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. [Internet]. *J. Exp. Med.* 1991;174(5):1209–20.[cited 2015 Oct 4] Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2119001&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Figure Legends

Figure 1: Inflammation in BALF.

BALF was isolated from non-stimulated (Control); moderate exercised (Exe) sedentary, ovalbumin-treated (OVA); and animals that performed moderate exercise and received ovalbumin treatment (OVA+Exe) and cytopsin was performed. At least 300 cells were counted per cytopsin. Total cell number (A) total eosinophils (B), neutrophils (C), lymphocytes (D), and macrophages (E). Inflammatory cells in the BALF of OVA-treated mice that performed moderate intensity exercise versus OVA-treated sedentary mice. *** $p < 0.001$.

Figure 2: Inflammatory cytokine production.

ELISAs were performed on BAL fluid isolated from non-stimulated (Control); moderate exercise (Exe) sedentary; ovalbumin treated (OVA); and moderate exercised plus ovalbumin treated (OVA+Exe). IL-4 (A), IL-5 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL12p70 (E), IL-13 (F) TNF- α (G). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Figure 3: Airway inflammation and remodeling

Non-stimulated (Control); moderate exercise (Exe) sedentary; ovalbumin-treated (OVA); and moderate exercised plus ovalbumin-treated (OVA+Exe). Hematoxylin and eosin staining of conducting airways was performed and eosinophils counted in the peribronchial space (5 complete airways per mouse per group). Control (A), Exe (B), OVA (C), OVA+Exe (D). Results are expressed as the number of eosinophils per mm^2 of conducting airways (E).

Picrosirius staining for collagen fiber quantification in Control, Exe, OVA and OVA+Exe groups were quantified and expressed as percentage of collagen fibers related to the total peribronchial area (F). *** $p < 0.001$.

Figure 4: Th2 cytokines in the mediastinal lymph nodes

Non-stimulated (Control); moderate exercise (Exe) sedentary; ovalbumin-treated (OVA); and moderate exercised plus ovalbumin treated (OVA+Exe). Elisa was performed on MLN for IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), IFN- γ (D). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Figure 5: Elisa measurements of supernatant collected from bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) cultures stimulated with ovalbumin from sedentary or exercised mice

On day ninth day of culture, cells isolated from lavages were pulsed with ovalbumin (100 μ g/mL) and the supernatant was collected for cytokine measurement using ELISA for cytokines. Results are expressed as the level of cytokines detected in cell free medium versus BMDCs collected in sedentary animals (Naïve/Medium) or cell free medium versus BMDCs derived from exercised-only (Exe/Medium) animals. BMDCs derived from sedentary mice stimulated with OVA were compared to non-stimulated BMDC isolated from sedentary mice (Naïve/OVA) as well as non-stimulated BMDCs derived from exercised mice versus BMDCs from exercised mice stimulated with OVA as (Exe/OVA). BMDCs derived from exercised only mice were more resistant to OVA induced cytokines IL-6, (A) CXCL1/KC (B), IL-12p70 (C), and TNF- α (D). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Figure 6: FACS analyses of bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) cultures stimulated with ovalbumin from sedentary or exercised mice

Results are expressed as the level of cytokines detected in cell free medium versus

BMDCs collected in sedentary animals (Naïve/Medium) or cell free medium versus BMDCs derived from exercised-only (Exe/Medium) animals. BMDCs derived from sedentary mice stimulated with OVA were compared to non-stimulated BMDC isolated from sedentary mice (Naïve/OVA) as well as non-stimulated BMDCs derived from exercised mice versus BMDCs from exercised mice stimulated with OVA as (Exe/OVA). MHC-II, (A) CD-80 (B), CD-83 (C), and CD-86 (D). Figure 6F and 6G are representative FACS histogram from CD80 and CD83 expression, respectively.

***p<0.001; **p<0.01, *p<0.05.

FIGURE 1

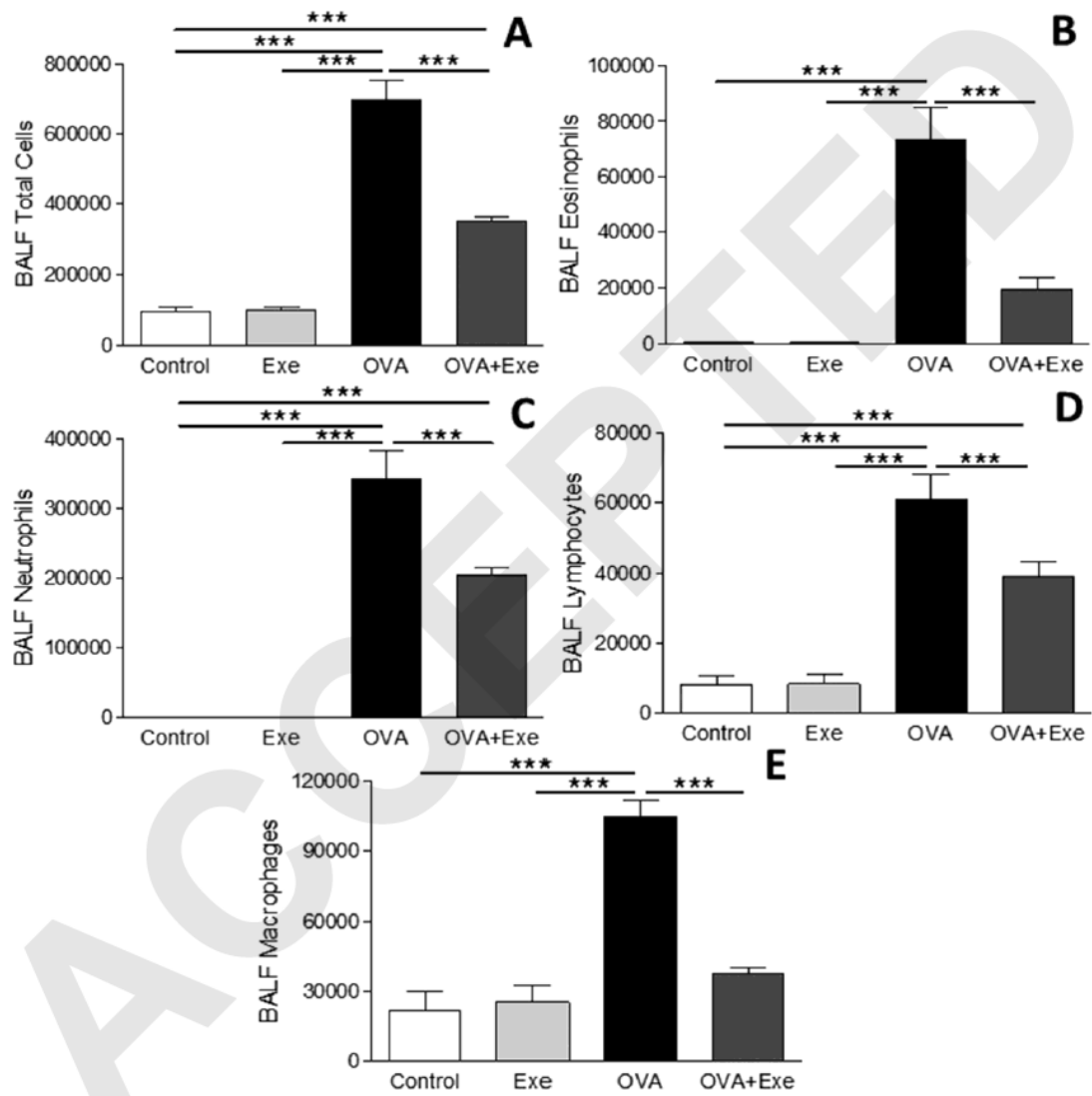


FIGURE 2

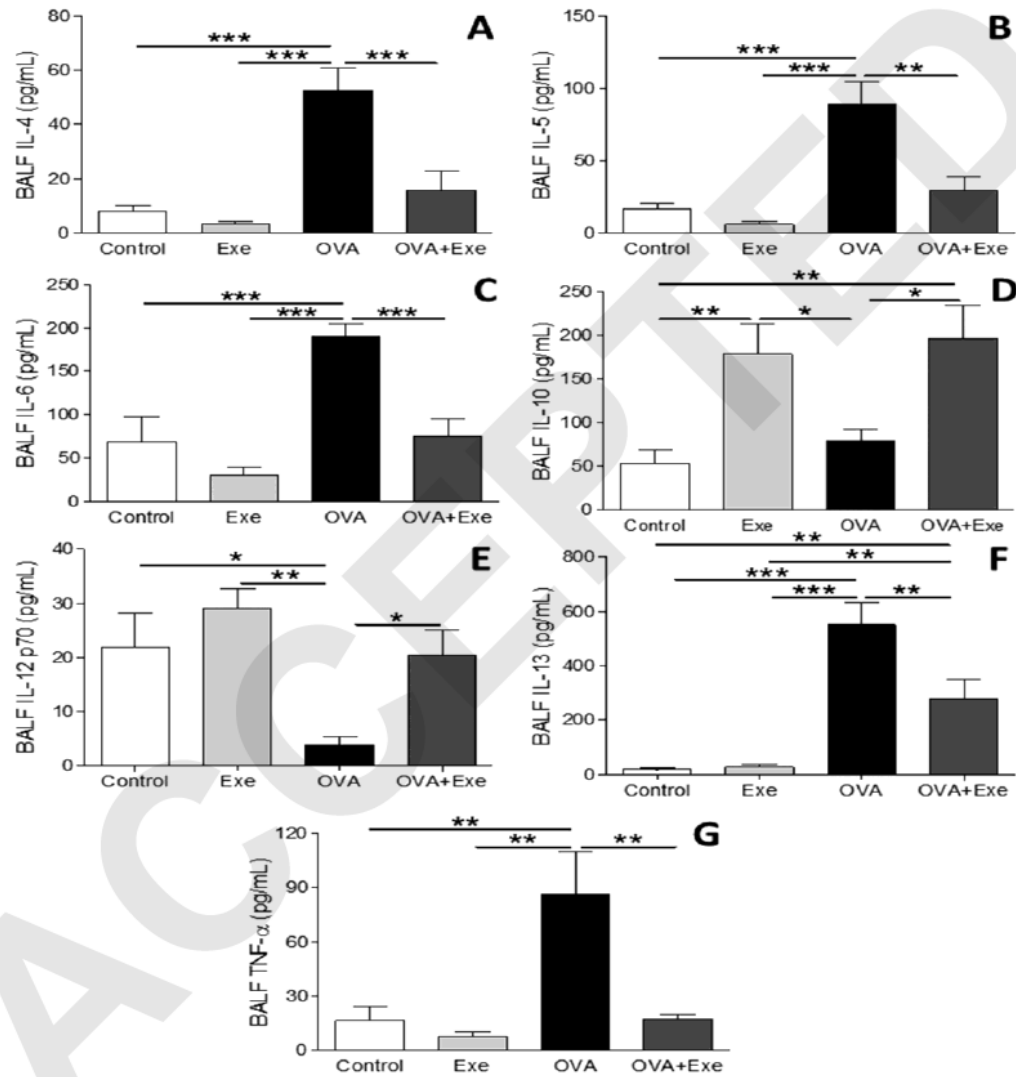


FIGURE 3

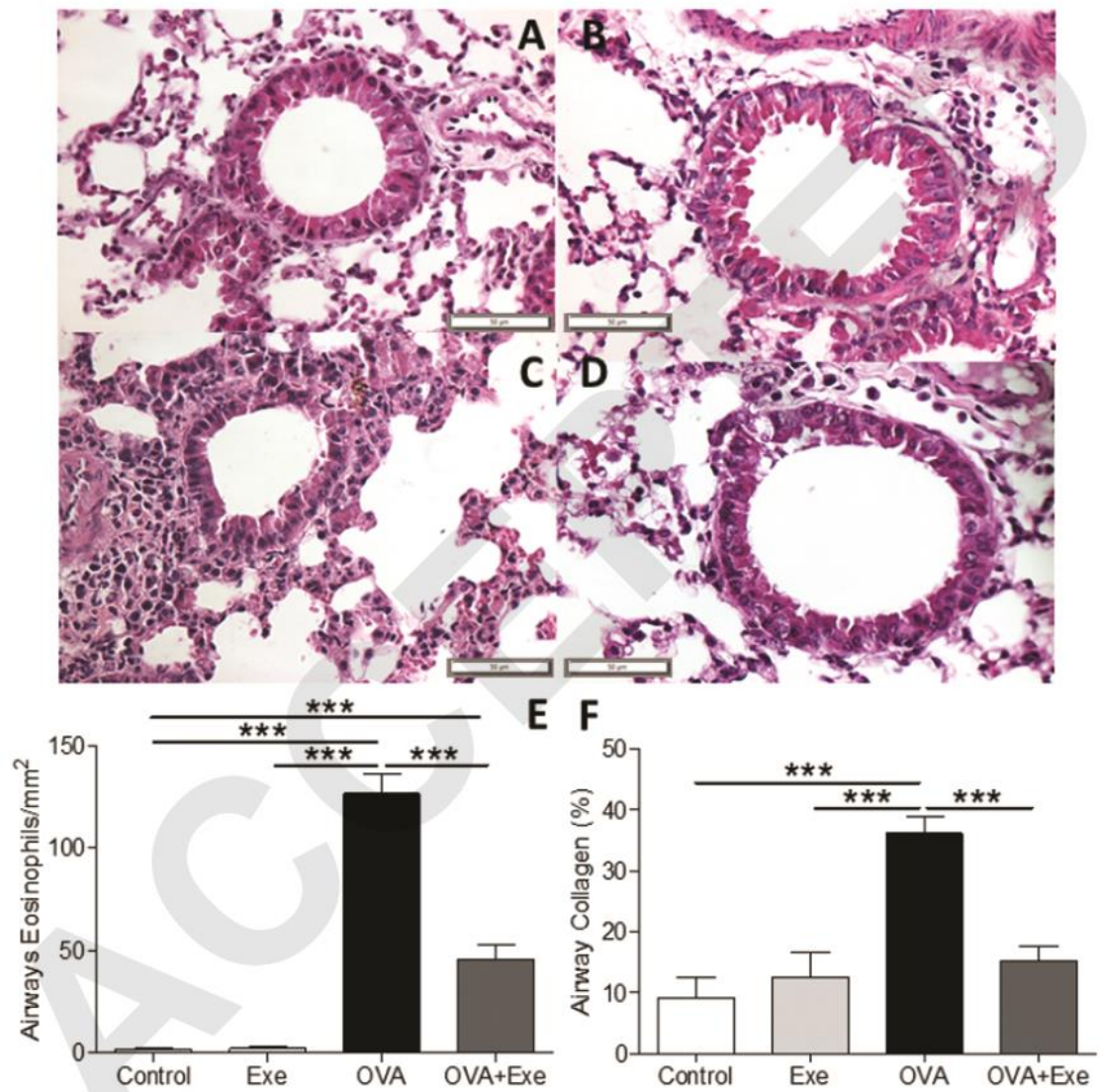


FIGURE 4

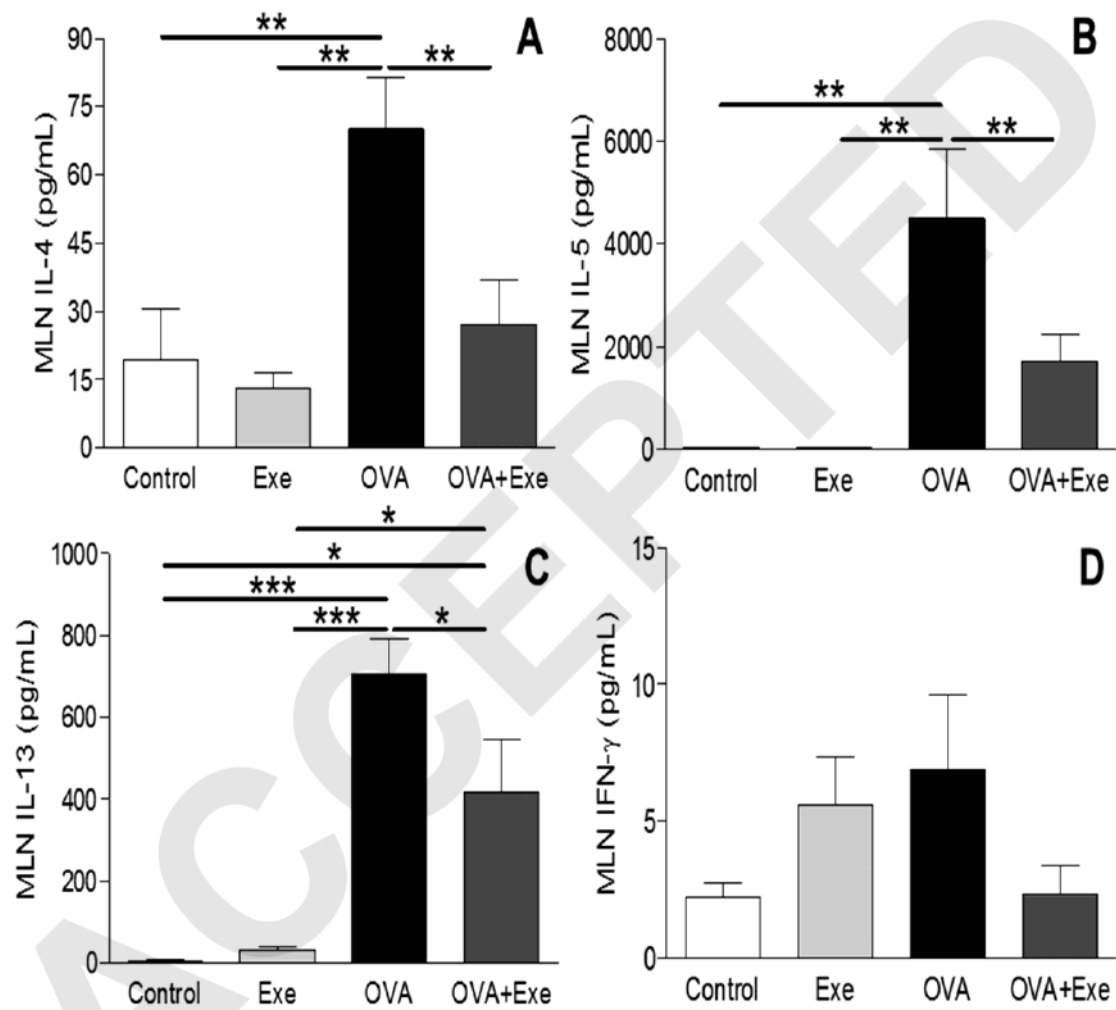


FIGURE 5

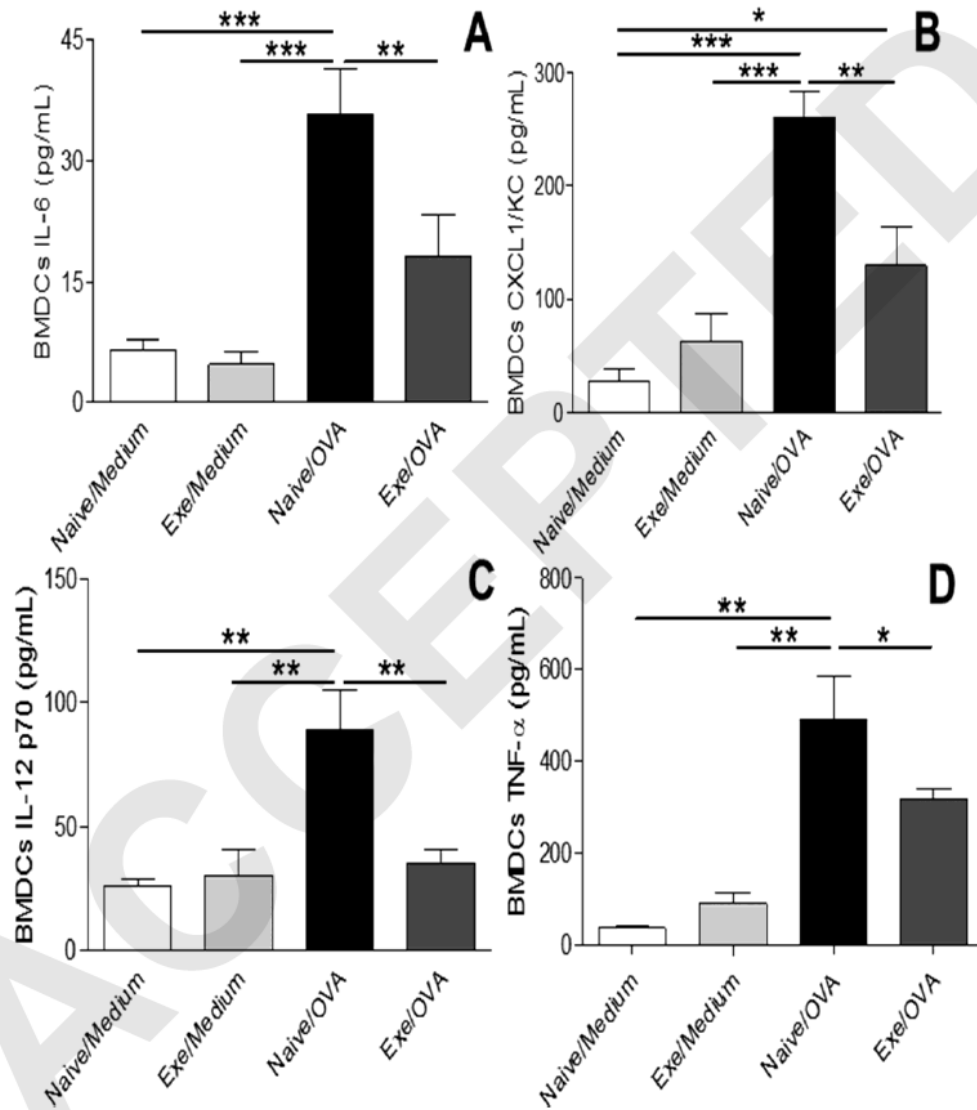
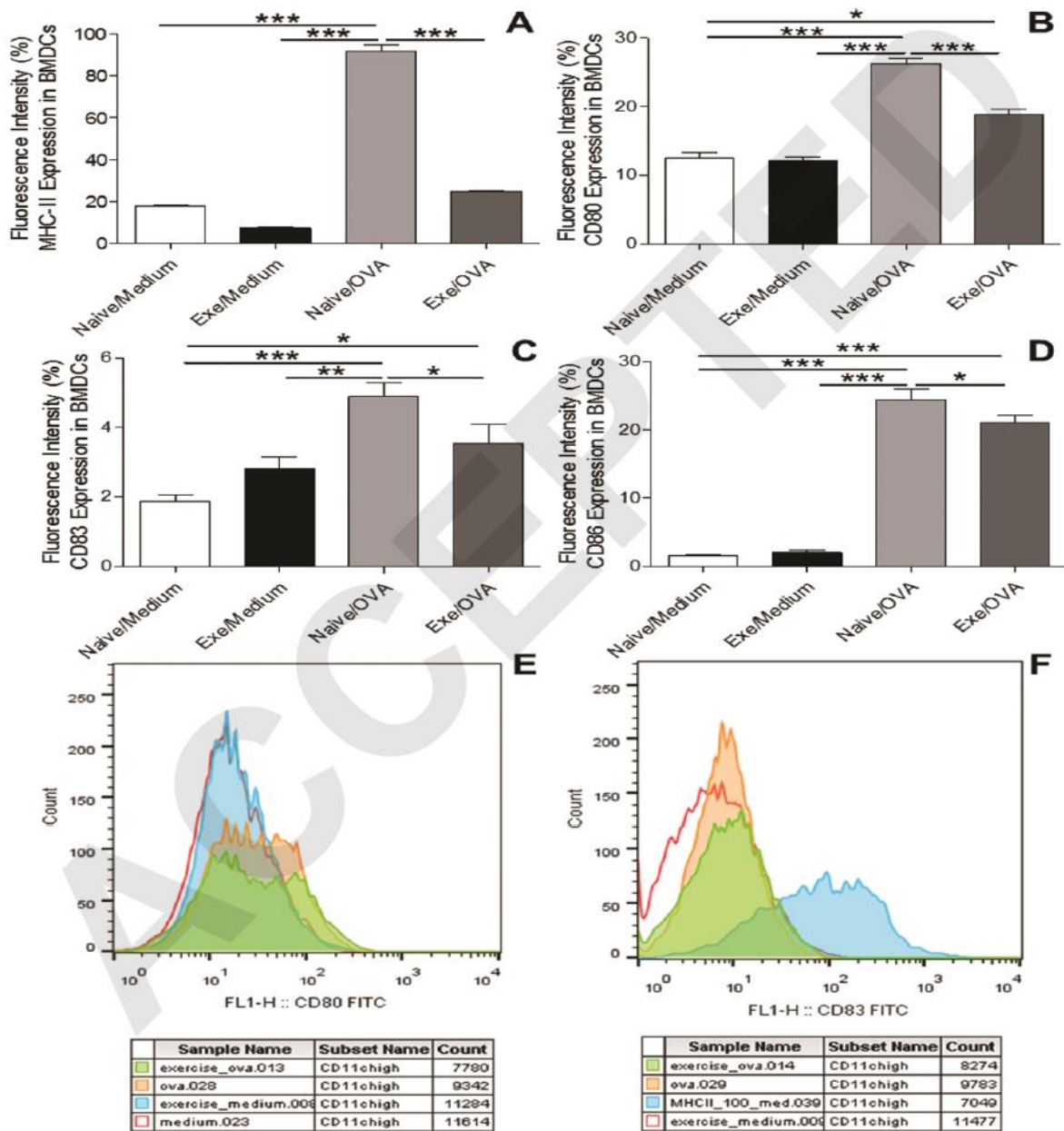


FIGURE 6



8.8 ANEXO 8 – ACEITE DO TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO NO FORMATO DE PÔSTER NO 10º CONGRESSO DA ALAT.



Erasmio Assumpcao Neto <erasmo.neto@gmail.com>

Erasmio Assumpção Neto – Resumen Aprobado al 10º Congreso ALAT

ALAT <web@alatorax.org>
Para: erasmio.neto@gmail.com

22 de março de 2016 23:35



Resultado de los Trabajos Científicos presentados al 10º Congreso ALAT, 2016



Resumen: **APROBADO**

Estimado/a Autor Responsable Erasmio Assumpção Neto

El Comité Organizador del 10º Congreso ALAT tiene el agrado de informarle que todo trabajo presentado como Resumen científico, bajo su cargo y responsabilidad, ha sido **aprobado**.

Agradecemos su aporte, que junto a los más de 500 resúmenes hará de nuestro 10º Congreso el evento más importante de 2016 en Salud y Medicina Respiratoria de toda América Latina.

De su interés

Esta aprobación representa para usted la obtención de su **Inscripción sin cargo al 10º Congreso ALAT**.

1. Todos los trabajos deben presentarse en formato de **POSTER** en el día, hora y lugar que le informaremos posteriormente.
2. Si su trabajo sale favorecido como uno de los 50 mejores del congreso, usted deberá presentarlo adicionalmente como **PRESENTACION ORAL**; esta información le será enviada en unas semanas.
3. Los trabajos premiados como orales tendrán además derecho a una **BECA** de alojamiento, desayuno e inscripción que el congreso otorga a las mejores investigaciones.

Ante cualquier consulta en el proceso de inscripción, por favor diríjase a inscripciones@alatorax.org

Muchas gracias por participar y lo esperamos en julio, en Santiago de Chile.
¡Nos vemos pronto!



¡Chile nos espera!

Santiago • Chile • 6 - 9 • Julio • 2016
Centro de Convenciones CASAPIEDRA

Nuestros Recursos públicos: www.alatorax.org | www.congresosalat.org
Nuestra Comunidad en Redes: [@ALATorax](https://twitter.com/ALATorax) | www.facebook.com/alatorax

8.9 ANEXO 9 - ACEITE DO TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO ORAL NO 10º CONGRESSO DA ALAT.




Erasmu Assumpcao Neto <erasmo.neto@gmail.com>

Erasmu Assumpção Neto: Presentará su Trabajo como COMUNICACIÓN ORAL en el 10º Congreso ALAT: ¡Felicitaciones!

ALAT <web@alatorax.org>
Para: erasmu.neto@gmail.com

9 de maio de 2016 16:20



www.alatorax.org

Estimado Dr . (a): Erasmu Assumpção Neto

Después de la evaluación realizada por los miembros del comité evaluador de trabajos de investigación del **10º Congreso de la ALAT** que se llevará a cabo del **6 al 9 de julio de 2016** en el Centro de Convenciones Casa Piedra de la ciudad de Santiago, Chile, queremos informarle que además de haber aceptado su trabajo en **modalidad de poster** (recibirá otro correo con las indicaciones), su investigación también ha sido **ACEPTADA para presentación como COMUNICACIÓN ORAL durante los simposios de investigación temáticos en el congreso**, según las siguientes indicaciones:

(Si usted ha presentado más de un trabajo y los mismos han sido aceptados para COMUNICACIÓN ORAL, recibirá mails consecutivos con cada título y trabajo aceptado).

ID 340
Título: BIOMARCADORES SÉRICOS E NASAIS NA INFECÇÃO PEDIÁTRICA PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
Autores: Assumpção-Neto,E; Durigon,TS; Oliveira-Junior,MC; Dias,AS; MacKenzie,B; Constancio,FS; El-Mafarjeh,E; Rigonato-Oliveira,NC; Brito,AA; Oliveira,APL; Oliveira, DBL; Durigon,EL; Vieira,RP.
País: Brasil.

Día de su Presentación ORAL: Thursday 07 Jul 2016
Hora: 10:00 a 11:00 hs
Salón asignado: Chichen Itzá

Duración de la presentación: 8 minutos de presentación por parte del autor (máximo 10 diapositivas) y 4 minutos de discusión dirigida por los moderadores asignados.

Las presentaciones de los simposios han sido agrupadas por diferentes temáticas y *sin ninguna otra actividad académica simultánea*, para darle mayor relevancia a la investigación en el congreso.

En cada simposio de una hora serán presentados **5 trabajos** (tiempo de cada trabajo 12 minutos) y será coordinado por dos moderadores de sesión quienes supervisarán de forma estricta el cumplimiento de los tiempos asignados.

¡Lo/a felicitamos!

Recuerde por favor:

Ante cualquier inquietud comunicarse con la Secretaría ALAT, a cargo de la Sra. Mariela Rodríguez: secretaria.alat@gmail.com

Cordialmente,

Comité Organizador del 10º Congreso ALAT

8.10 ANEXO 10 – PRÊMIO DADO AOS 50 MELHORES TRABALHOS DO 10º CONGRESSO DA ALAT.



ErasmO Assumpcao Neto <erasmo.neto@gmail.com>

Beca alojamiento Congreso ALAT 2016

Secretaria ALAT <secretaria.alat@gmail.com>

27 de maio de 2016 18:00

Responder a: secretaria@alatorax.org

Para: ErasmO Assumpcao Neto <erasmo.neto@gmail.com>

Cc: Juan Carlos Mejia <diroperaciones@alatorax.org>

Estimado Dr.Assumpcao-Neto

En nombre del Comité Científico del Congreso ALAT 2016, tenemos el agrado de informarle que debido a algunas declinaciones previas, Ud (o quien presente el trabajo) ha sido favorecido con beca de alojamiento en Santiago por un máximo de 4 noches por el siguiente trabajo:

BIOMARCADORES SÉRICOS E NASAIS NA INFECÇÃO PEDIÁTRICA PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
Assumpção-Neto,E; Durigon,TS; Oliveira-Junior,MC; Dias,AS; MacKenzie,B; Constancio,FS; El-Mafarjeh,E;
Rigonato-Oliveira,NC; Brito,AA; Oliveira,APL; Oliveira,DBL; Durigon,EL; Vieira,RP.

Rogamos confirme si hará uso de esta beca a la brevedad posible.

Muchas gracias y saludos,

Mariela Rodriguez

Secretaria ALAT

Email: secretaria@alatorax.org

Móvil: (598) 94251509

www.alatorax.org



8.11 ANEXO 11 – ACEITE DO TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO NO FORMATO DE PÔSTER NO ERS INTERNATIONAL CONGRESS 2016 – LONDON



Disconnect

Step 1 - Check your submitted abstracts

n °2884	Effects of low level laser therapy in experimental model of asthma induced by house dust mite	<i>Accepted for Thematic Poster</i>
n °3396	New serum and nasal immunological biomarkers in pediatric infection caused by respiratory syncytial virus	<i>Accepted for Thematic Poster</i>

8.12 ANEXO 12 – ARTIGO PUBLICADO



RESEARCH ARTICLE

Aerobic Exercise Attenuated Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Th2-Dominant Mice

Adilson Santos Andrade-Sousa^{1*}, Paulo Rogério Pereira^{1*}, BreAnne MacKenzie^{1*}, Manoel Carneiro Oliveira-Junior¹, Erasmo Assumpção-Neto¹, Maysa Alves Rodrigues Brandão-Rangel¹, Nilza Regina Damasceno-Rodrigues², Elia Garcia Caldini², Ana Paula Pereira Veloso³, Walcy Rosolia Teodoro³, Ana Paula Ligeiro de Oliveira¹, Marisa Dolnikoff⁴, Oliver Eickelberg⁵, Rodolfo Paula Vieira^{1*}

1 Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LAPPE) and Brazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPPE), Nove de Julho University (UNINOVE), Rua Vergueiro, 235/240, São Paulo – SP, Brazil, **2** Laboratory of Cellular Biology (LIM59), School of Medicine, University of São Paulo, Avenida Doutor Arnaldo, 455, São Paulo – SP, Brazil, **3** Laboratory of Medical Investigation (LIM 17), School of Medicine, University of São Paulo, Avenida Doutor Arnaldo, 455, São Paulo – SP, Brazil, **4** Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, Avenida Doutor Arnaldo, 455, São Paulo – SP, Brazil, **5** Comprehensive Pneumology Center (CPC), Ludwig Maximilian Universität München and Helmholtz Zentrum München, Max-Planck-Platz 31, München, Germany

* These authors contributed equally to this work.

* adilsona@yahoo.com.br



OPEN ACCESS

Citation: Andrade-Sousa AS, Pereira RP, MacKenzie BA, Oliveira-Junior MC, Assumpção-Neto E, Brandão-Rangel MAR, et al. (2016) Aerobic Exercise Attenuated Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Th2-Dominant Mice. *PLoS ONE* 11(9): e0163420. doi:10.1371/journal.pone.0163420

Editor: Rainer Fehrenbach, Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, GERMANY

Received: April 23, 2016

Accepted: September 8, 2016

Published: September 27, 2016

Copyright: © 2016 Andrade-Sousa et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2012/15165-2 and 2012/51464-4. A.S. holds a PhD fellowship from CAPES. BM holds a postdoctoral fellowship from FAPESP (2014/23196-0). MOCJ holds a PhD fellowship from FAPESP (2014/14804-8).

Abstract

Introduction

The aim of this study was to investigate the effect of aerobic exercise (AE) in reducing bleomycin-induced fibrosis in mice of a Th2-dominant immune background (BALB/c).

Methods

BALB/c mice were distributed into: sedentary, control (CON), Exercise-only (EX), sedentary, bleomycin-treated (BLEO) and bleomycin-treated+exercised (BLEO+EX); (n = 8/group). Following treadmill adaptation, 15 days following a single, oro-tracheal administration of bleomycin (1.5U/kg), AE was performed 5 days/week, 60min/day for 4 weeks at moderate intensity (60% of maximum velocity reached during a physical test) and assessed for pulmonary inflammation and remodeling, and cytokine levels in bronchoalveolar lavage (BAL).

Results

At 45 days post injury, compared to BLEO, BLEO+EX demonstrated reduced collagen deposition in the airways (p<0.001) and also in the lung parenchyma (p<0.001). In BAL, a decreased number of total leukocytes (p<0.01), eosinophils (p<0.01), lymphocytes (p<0.01), macrophages (p<0.01), and neutrophils (p<0.01), as well as reduced pro-inflammatory cytokines (CXCL-1; p<0.01), (IL-1β; p<0.001), (IL-5; p<0.01), (IL-6; p<0.001), (IL-13; p<0.01) and pro-fibrotic growth factor IGF-1 (p<0.001) were observed. Anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased (p<0.001).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusion

AE attenuated bleomycin-induced collagen deposition, inflammation and cytokines accumulation in the lungs of mice with a predominately Th2-background suggesting that therapeutic AE (15–44 days postinjury) attenuates the pro-inflammatory, Th2 immune response and fibrosis in the bleomycin model.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) affects primarily men in the 5th decade of life at a rate of 4–12/100,000, and has a prognosis of 3–5 years following diagnoses [1]. Patients present dyspnea due to expanding fibrotic lesions caused by the accumulation of extracellular matrix proteins in the lung parenchyma, which gradually destroys alveoli leading to insufficient gas exchange. While surfactant protein folding defects are responsible for a small percentage of pulmonary fibrosis [2], most cases are idiopathic. Studies suggest that repetitive epithelial injury caused by environmental or endoplasmic reticulum (ER) stress, combined with an aberrant wound repair mechanism may be partly to blame but the exact mechanisms remain unknown [3,4]. While some drugs slightly reduce the rate of lung function decline, treatment options remain palliative [5]. Though the role of inflammation in IPF, specially from Th2 background, including the treatment of IPF with anti-inflammatories is hotly debated [6], the expression of Th2 cytokines, specifically IL-4 and IL-5, predominate over Th1 cytokine, IFN- γ , as accredited to play an important role for progression of pulmonary fibrosis [2].

Aerobic exercise (AE) has been found to reduce Th2-mediated inflammation in murine allergic asthma models [8,9] and some clinical studies with allergic asthma patients show that exercise may be beneficial [10–12]. In the context of IPF, recent clinical studies have highlighted that while exercise does not cure IPF, pulmonary rehabilitation programs that incorporate physical training improve the patient's six-minute walk scores, body composition, and quality of life [13–15] with some patients responding more positively than others.

Though bleomycin was originally used as an anti-cancer drug, given its DNA cleaving and anti-tumorigenic activity, its systemic use was repealed due to the occurrence of a lethal, bleomycin-induced pulmonary fibrosis side effect [16,17]. Oro-tracheal administration of bleomycin in rodents is currently the most utilized animal model of IPF as the lesions formed due to bleomycin are histologically similar to those observed in IPF [18]. However, the model is limited, as mice are able to repair the lesions over time. The rate of repair however is often used to indicate whether a particular molecule, pathway or treatment could potentially be beneficial to IPF patients. While two studies have shown that chronic, moderate AE attenuates bleomycin-induced fibrosis [19,20], this study uses mice of a Th2-dominant immune-responsive background (BALB/c) to test for the first time, the hypothesis that AE accelerates the resolution of bleomycin-induced airway fibrosis in part by attenuating the Th2 immune response.

Methods

We also state that all experiments were approved by the ethical committees of the University of Sao Paulo School of Medicine and Nove de Julho University (375/13). Experiments were carried out in accordance to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication no. 85–23, revised 1996). During the

whole experiment, the animals did not present any alteration in health status, which was monitored 5x/week prior the physical training sessions. Also, no mice died during the experiments.

Animals and experimental groups

BALB/c, male mice (20–25 g) were obtained from the Central Animal Facility of School of Medicine of the University of São Paulo and distributed into Control (Con), Exercise (Ex), Bleomycin (Bleo) and Bleomycin+Exercise (Bleo+Ex) groups ($n = 8/\text{group}$).

Bleomycin-induced pulmonary fibrosis protocol

Bleomycin sulfate (1.5 UI/kg; Meizler Biopharma, SP, Brazil) was administered oro-tracheally under anesthesia (ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg).

Exercise test and aerobic training protocol

The aerobic training protocol began 15 days after bleomycin administration. Adaptation to treadmill training was performed as previously described [8,21]. Following 3 days of adaptation (15 min/day, 25° incline, 0.2 Km/h), animals were submitted to a physical test (beginning at 0.2 Km/h, increasing 0.1 Km/h every 2.5 minutes) until animals were exhausted. Exhaustion was defined as failure to run following 10 gentle, mechanical stimuli [8,22]. Treadmill training was performed at 60% of the maximum velocity reached in the physical test during 4 weeks, 5x/week, 60 minutes/session. Twenty-four hours before euthanasia (ketamine 200 mg/kg and xylazine 20 mg/kg), the final physical test was performed [8,22].

Quantification of collagen fibers in the airways wall and in the lung parenchyma

Following transcardiac de-sanguination with phosphate buffered saline (PBS), left lobe were excised, fixed in 4% formalin solution, embedded in paraffin and sectioned in five micrometers slices. The serial sections were done in approximately 2 mm deep into the lung tissue to assure that central to distal airways would be reached in the sections. Picro Sirius Red staining for collagen fibers was performed as previously described [9,22–24]. Collagen fibers were detectable via light microscopy (red staining) and the extent of collagen content was determined in the walls of five airways per mouse, in all 8 mice of each group and also in fifteen lung parenchyma fields per mouse (at 20X magnification) using the Image Pro Plus 4.5 software.

First, to assess collagen content within the airway wall, the airway area (defined as the area between the epithelial basement membrane and airway adventitia) was delimited; vessels were excluded. Next, a constant color threshold was calculated for the analyses of all samples by subtracting the difference of staining intensity between controls and fibrotic animals. This threshold was calculated by the software and was used consistently to measure the areas of red staining. Airway collagen content was calculated as the relation between the area of red staining within the airway wall and the total airway area [9,22–24] and results expressed as percentage. Airway collagen content in each animal was calculated as mean values of 5 airways.

For quantification of collagen content in the lung parenchyma, first the total area of lung parenchyma in each field was determined and also the area of air spaces. The parenchymal tissue area was determined in each field by subtracting the air spaces area from the total parenchymal area. Then, using a constant color threshold, the red staining area was determined within the lung parenchyma (15 fields per animal). Parenchyma collagen content in each field was then calculated as the relation between the parenchymal area of collagen fibers and the total parenchyma area in the field and expressed as percentage.

Collection and analyses of bronchial alveolar lavage (BAL) fluid

Following anesthetization, a cannula was inserted into the trachea and lungs were washed with 2x 500ml of PBS. BAL fluid was centrifuged at 900g for 10 minutes at 4°C. Supernatant was stored at -80°C for further ELISA experiments, and the cell pellet was resuspended in 1ml of PBS for total cell count (Neubauer chamber) and differential cell count analyses (cytospin preparation). Cytospins were stained with Diff Quick and differential cell counts were performed based on hematological criteria, considering 300 cells [25].

Cytokines Measurements in BAL Fluid

The levels of IL-1 β (432603; Biolegend, CA, USA), IL-5 (431203; Biolegend, CA, USA), IL-6 (431303; Biolegend, CA, USA), CXCL-1/KC (DY453; RD Systems, MN USA), IL-10 (431413; Biolegend, CA, USA), IL-13 (DY413; RD Systems, MN, USA) and IGF-1 (DY791; RD Systems, MN USA), were measured in BAL fluid using ELISA kits according to the manufacturers' recommendations.

Statistical analysis

The software Graph Pad Prism 5.0 was used to perform statistical analysis and also for graphs. The normality of the data was tested by Shapiro-Wilk test and the data was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-hoc test. Significance levels were considered for $p < 0.05$. Values were expressed as mean \pm SD.

Results

Collagen deposition in the airways and in the lung parenchyma was reduced by aerobic exercise

Picro Sirius Red staining (red indicates collagen expression) was used to visualize the extent of collagen deposition in the airways wall in sedentary (CON) animals (Fig 1A), exercise only (EX) (Fig 1B), sedentary bleomycin (BLEO) (Fig 1C), and exercised bleomycin animals (BLEO+EX) (Fig 1D). An increase in collagen fibers was observed in BLEO mice compared to CON and EX while BLEO+EX mice showed less collagen than the BLEO group. In summary, these observations ($n = 8$ /group) were quantified by image analysis software (Fig 1E) and showed that aerobic exercise (AE) decreased the extent of bleomycin-induced collagen deposition. In addition, parenchymal remodeling was also evaluated in sedentary (CON) animals (Fig 1F), exercise only (EX) (Fig 1G), sedentary bleomycin (BLEO) (Fig 1H), and exercised bleomycin animals (BLEO+EX) (Fig 1I). An increase in collagen fibers in the lung parenchyma was observed in BLEO mice compared to CON and EX while BLEO+EX mice showed less collagen than the BLEO group. In summary, these observations ($n = 8$ /group) were quantified by image analysis software (Fig 1J) and showed that aerobic exercise (AE) decreased the extent of bleomycin-induced collagen deposition.

Aerobic exercise decreased bleomycin-induced inflammatory cells in BAL

In Fig 2, total and differential cell counts of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid ($n = 8$ animals/group) were analyzed. Total cell count was slightly reduced in EX group compared to CON animals (Fig 2A) but not to a statistically significant extent. An increase in the total number of cells in the BAL fluid of BLEO mice was detected (Fig 2A). In BLEO+EX, this number was reduced to the levels of the CON group (Fig 2A). Differential cell counts for macrophages

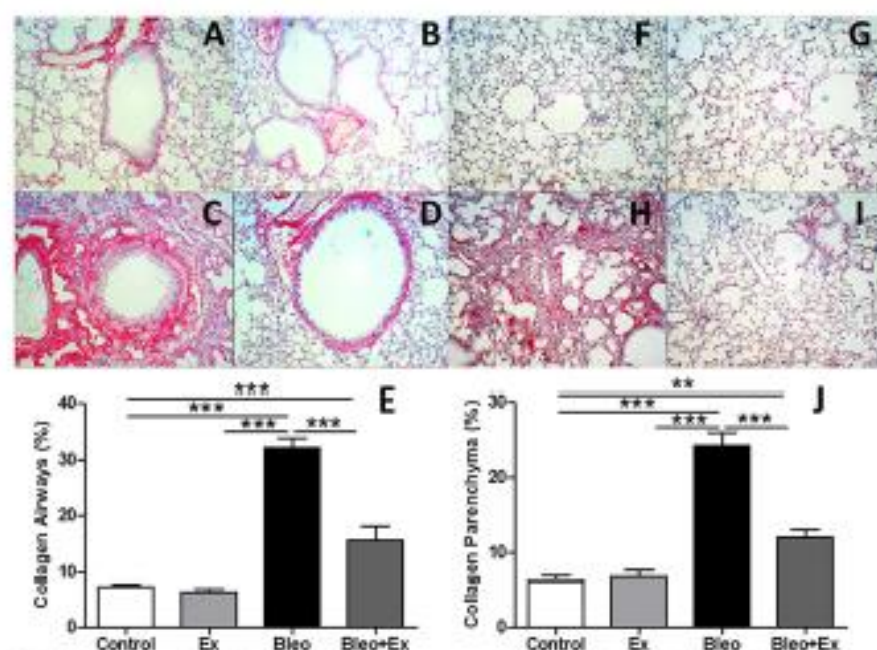


Fig 1. Collagen deposition in the airways and in the lung parenchyma. (A–D) Representative light microscopy images (20X) of Picro Sirius Red staining (red indicates collagen expression) in the airways wall of: Control, Ex, Bleo, Bleo+Ex groups, respectively) and in the (F–I) lung parenchyma; Control, Ex, Bleo, Bleo+Ex groups, respectively). (E) Quantitative analysis of collagen deposition in the airways and (J) in the lung parenchyma. These observations ($n = 8$ /group) were quantified by image analysis software. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$. Scale bars: 100um.

doi:10.1371/journal.pone.0163420.g001

(Fig 2B), neutrophils (Fig 2C) and lymphocytes (Fig 2D) showed the same pattern: compared to CON, EXE only mice showed a trend towards a decrease in immune cells, while cell counts were significantly augmented in BLEO only mice and reduced in BLEO+EX compared to BLEO only. Very few eosinophils were detected in CON and EX mice compared to BLEO mice (Fig 2B). Eosinophil number was decreased in BLEO+EX mice compared to BLEO mice (Fig 2E). In summary, AE reduced the number of bleomycin-induced inflammatory cells in BAL.

Aerobic exercise diminished the expression of bleomycin-induced pro-inflammatory cytokines and IGF-1 in BAL

The pro-inflammatory cytokine IL-1 β , was increased in BLEO and decreased in BLEO+EX (Fig 3A). Pro-inflammatory cytokines IL-5, IL-6, and IL-13 showed were also increased in BLEO and decreased in BLEO+EX (Fig 3B, 3C and 3D respectively). The neutrophil chemo-attractant CXCL-1/KC was increased in BLEO mice and reduced in BLEO+EX group (Fig 3E). Anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased in EX compared to CON and further increased in BLEO+EX compared to all groups (Fig 3F). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), implicated as a potent, pro-fibrotic, fibroblast growth factor in the context of IPF and bleomycin-induced fibrosis, was increased in the BLEO group, and reduced in the BLEO+EX group (Fig 3G).

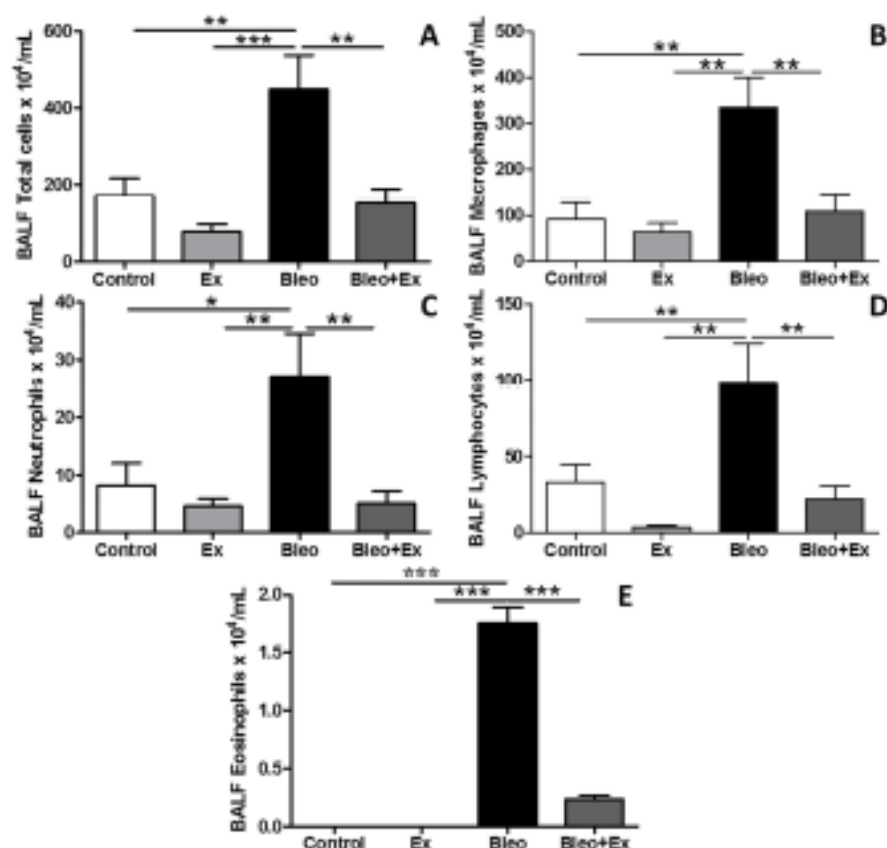


Fig 2. Total and differential cell counts of inflammatory cells in BAL. Total and differential analysis of immune cells ($n = 8$ /group) in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in Sedentary (CON), exercise-only (EX), sedentary bleomycin (BLEO), and exercised bleomycin animals (BLEO+EX). (A) Total cell count, (B) macrophages, (C) neutrophils, (D) lymphocytes, and (E) eosinophils. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0163420.g002

Discussion

Using a Th2-dominant immune-responsive background (BALB/c), this study tested for the first time the hypothesis that AE accelerates the resolution of bleomycin-induced airway fibrosis in part by attenuating the Th2 response, as demonstrated by reduced levels of IL-5 and IL-13. While other strains of mice also mount a mild Th2 inflammatory cytokine response to bleomycin treatment, the Th2 reaction is significantly stronger in BALB/c mice than in other strains [26–28]. Though the role of Th2 cytokines in IPF is debated; as patients present with very little overt inflammation at the time of diagnosis, inflammation is suspected to play a role in the early stages of disease [23]. Though mere overexpression of IL-13 in mice lead to increased fibrosis [24], and a clinical study using anti-IL-13 therapy is currently underway (NCT01872689), it is important to note that so far, therapies attenuating either Th1 [29] or

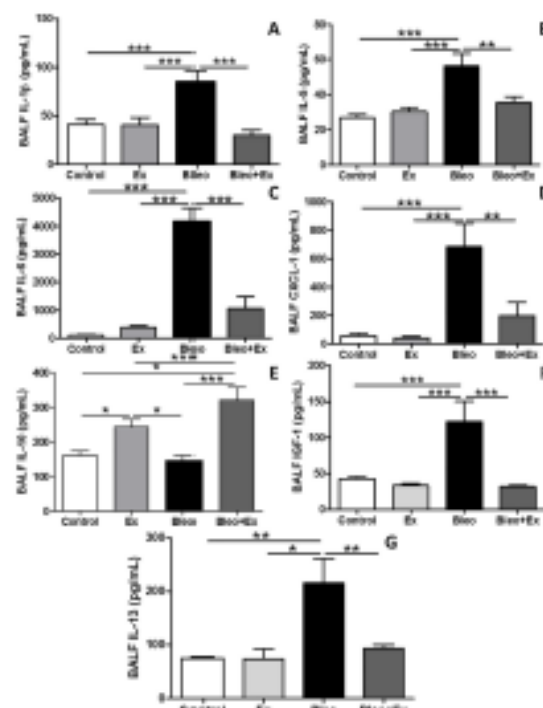


Fig 3. Cytokine and growth factor levels in BAL. Cytokines and a growth factor in BAL were analyzed by ELISA ($n=6$ /group): Sedentary (CON), exercise-only (EX), sedentary bleomycin (BLEO), and exercised bleomycin animals (BLEO+EX). (A) IL-1 β , (B) IL-5, (C) IL-6, (D) CXCL-1, (E) IL-10, (F) IGF-1 and (G) IL-13. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$ and * $p<0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0163420.g003

Th2 inflammation [30,31] do not generally lead to better overall outcomes for IPF patients [32]. Therefore, if increased Th2 inflammation indeed contributes to the onset of IPF, exercise-induced attenuation of Th2 inflammation may be more beneficial as a preventative therapy. However, the anti-fibrotic effects of exercise are not limited to the immune system as demonstrated in a recent study which implicated decreased 5-serotonin and Akt-signaling in the reduction of fibrosis [33]. In summary, further studies are needed in order to fully understand the extent and mechanisms by which aerobic exercise attenuates fibrosis.

In a more recent study, C57BL/6 (Th1-dominant background) mice were subjected to the same treadmill protocol used in the present study (moderate intensity running at 60% maximal capacity, for 4 weeks, beginning at 15 days post-injury) [20]. C57BL/6 (BLEO+EX) also showed decreased inflammation and fibrosis, and attenuated Akt and serotonin signaling compared to BLEO. Both Akt and serotonin pathways promote and sustain fibroblast growth. While a reduction in collagen fibers in the lung parenchyma ($p<0.01$) was reported in the C57BL/6 study, they were reduced to a lesser extent than in this study ($p<0.001$). However, the accuracy of collagen content measurement reported by this study is limited due to the low proportion of actual 2D areas measured versus total lung area and the lack of stereological methods [34].

In addition, the study of Pereira et al., also observed that AE reduced the influx of inflammatory cells, except for eosinophils, a classical inflammatory cell involved in allergic inflammation. Furthermore, pro-inflammatory cytokines: CXCL1/KC, IL-1 β , and IL-6 were reduced. However, the reduction in inflammation also occurred to a lesser extent than in BALB/c mice despite the use of the same treatment protocols. Pereira et al., observed an increase in anti-inflammatory cytokine IL-10 due to AE as well, but also to a lesser extent than in BALB/c mice used in this study. These differences highlight not only the potent anti-inflammatory effect of AE in a Th2 dominant background vs. a Th1 dominant background but also the significant affect that heterogeneous immune compositions may have on IPF patient treatment responses to pulmonary rehabilitation therapy. As observed in recent, preliminary clinical studies with exercise and IPF patients, some individuals respond more positively than others to exercise [13,35]. Therefore, it may be prudent for future clinical studies that combine IPF and therapeutic exercise to examine the levels of Th2 cytokines in blood or BAL.

A precedent has already been set in the literature for the ability of exercise to dampen Th2-mediated immune responses, especially in the context of allergic asthma. For example, in ovalbumin-treated mice, just a single bout of exercise decreased ovalbumin-induced Th2 cytokines IL-5 and IL-13 [26]. Extended protocols have shown a reduction in eosinophils, CD3+ and CD4+ lymphocytes, CXCL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, resulting in a decrease in airway remodelling, mucus synthesis, smooth muscle thickness, and airway resistance [25,37,38]. Therefore, not surprisingly, in the present study, pro-inflammatory IL-13 and IL-5, the neutrophil chemo-attractant CXCL-1, as well as the total number of eosinophils, lymphocytes and neutrophils, were all reduced in BLEO+EX compared to BLEO alone.

While eosinophilia and IL-4 expression may be expendable in rodent fibrosis models [39] IL-4 itself is neither particularly elevated in sera [40], nor in BAL of end-stage IPF patients [41]. However, receptors IL-4R α , as well as IL-13 receptors: IL-13R α 2, and IL-13R α 1, are up-regulated in fibroblastic foci of IPF patients [42]. IL-13, is a pro-fibrotic, Th2 cytokine that increases collagen synthesis in fibroblasts and its expression may correlate with the severity of IPF [43,44]. IL-13^{-/-} mice are in fact protected from FITC-induced fibrosis [45]. Clinical studies using Tralokinumab, a human recombinant monoclonal antibody against IL-13 are in progress [46,47]. Therefore, attenuation of IL-13 by moderate AE may be an important therapeutic benefit of pulmonary rehabilitation for IPF patients.

This study also looked for the first time at the expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1), a pro-fibrotic growth factor, in the context of AE and bleomycin injury. Low intensity exercise has been shown to decrease IGF-1 levels in low-intensity exercisers after a period of six-weeks and is associated with decreased risk of cardiovascular disease [48]. A small trend towards a reduction was observed in EX compared to CON and a significant reduction was observed in BLEO+EX compared to BLEO. In non-IPF patients, IGF-1 localized exclusively to alveolar macrophages. In contrast, in IPF-patients, the domain of IGF-1 expression is expanded to interstitial macrophages, alveolar epithelial cells, and ciliated columnar epithelial cells. IGF-1 expression by interstitial macrophages was found to correspond positively to the level of fibrosis in IPF patients [49]. In this model, AE not only reduced IGF-1 but also IL-4 and IL-13 which have been shown to stimulate IGF-1 in macrophages and myofibroblasts [50]. Furthermore, AE also resulted in a decrease in the number of macrophages in BLEO+EX lungs thus reducing a potential source of pro-fibrotic IGF-1.

In addition, this study also evaluated pro-inflammatory cytokine IL-1 β expression as genetic over-expression models can cause a pulmonary fibrotic phenotype [51] similar to bleomycin-induced fibrosis. In both IL-1 β and bleomycin-induced fibrosis in rodents, the development of fibrosis was IL-17 dependent [52]. Both IL-17 and IL-1 β expression are increased in IPF patient BAL [53]. Interestingly, Wilson et al., also demonstrated that IL-10 inhibits the pro-

inflammatory, pro-fibrotic IL-23–IL-17A pathway rather than the IL-12–IFN- γ (Th1) axis. Although IL-17 was not measured in the current study, taken together, the increase in IL-10 in the BLEO+EX group likely had a strong anti-inflammatory and anti-fibrotic effect due to inhibition of IL-1 β by IL-10. AE-dependent increases in IL-10 may also be responsible for the reduction of IL-6 in the BLEO+EX group as IL-6 is known to induce IL-10, and IL-10 in turn inhibits IL-6. While there was significant variability found in the expression of IL-1 β and IL-6 in alveolar macrophages isolated from IPF patients [54] increased levels of these cytokines in BAL fluid are associated with IPF [53,55]. Interestingly, IPF patients with polymorphisms in IL-10 which may affect the efficiency of IL-10 translocation and signal peptide cleavage have been identified [56] which may contribute to a pro-inflammatory environment. Thus, in IPF patients with these IL-10 polymorphisms, it would be unlikely that an AE-induced increase in IL-10 alone could attenuate an aberrant Th2 immune response. Furthermore, though genetic IL-10 overexpression was found to attenuate inflammation and fibrosis in mice [57,58], lung-specific overexpression of IL-10 was found to cause fibrosis in a STAT-independent manner [59]. Therefore, a tight regulation of Th2 cytokines is likely important for fibrosis repair.

Conclusions

These results support the significance of the individual immune response in the context of a complicated, heterogeneous pulmonary disease: IPF. These findings suggest that future IPF and exercise studies should more closely examine not only the Th2 cytokine levels in patients who respond to exercise, but also additional potential mechanisms by which exercise may have a more positive outcome in particular individuals. Finally, although increased inflammation in IPF surgical lung biopsies predict poorer disease outcome [60] and many studies suggest that inflammation may play a role in acute exacerbations of IPF [61], an occurrence which often ends in death [31], corticosteroids are not an effective treatment for IPF patients [30]. Therefore, although moderate exercise decreased the Th2 immune response in this model, whether or not inhibition of Th2 cytokines was the most important exercise-induced anti-fibrotic effect remains unknown. Future studies should investigate alternative, beneficial exercise-induced modulations in growth factors pathways, hormones, apoptosis, and cell survival pathways, which may have a central role in exercise-mediated anti-fibrotic effects.

Supporting Information

S1 File. Raw data is available for Figs 1A–1H, 2A–2E and 3A–3G.
(DOCX)

Acknowledgments

This study was supported by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), grants 2012/15165-2 and 2012/51464-4. ASAS holds a PhD fellowship from CAPES. BM holds a postdoctoral fellowship from FAPESP (2014/23196-0). MCOJ holds a PhD fellowship from FAPESP (2014/14604-8).

Author Contributions

Conceptualization: EGC APLO MD OE RPV.

Data curation: MCOJ RPV MD OE ASAS.

Formal analysis: MCOJ RPV MD.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26884843>. Accessed 4 December 2015. doi: [10.1185/0003681017707](https://doi.org/10.1185/0003681017707) PMID: [26884843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26884843/)
12. Fraga-Pinto A, Mendes FAR, de Carvalho-Pinto RM, Agondi RC, Cukier A, et al. (2015) Aerobic training decreases bronchial hyperresponsiveness and systemic inflammation in patients with moderate or severe asthma: a randomised controlled trial. *Thorax* 70: 730–739. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26053927>. Accessed 22 November 2015. doi: [10.1136/thorax-2015-208372](https://doi.org/10.1136/thorax-2015-208372) PMID: [26053927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26053927/)
 13. Nishiyama O, Kondoh Y, Kimura T, Kato K, Katada K, et al. (2008) Effects of pulmonary rehabilitation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 13: 394–399. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18399492>. Accessed 17 March 2016. doi: [10.1111/j.1440-1845.2007.01206.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1845.2007.01206.x) PMID: [18399492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18399492/)
 14. Vainshelboim B, Fox BD, Oliveira J, Kramer MR (2016) Exercise training in idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Rev Respir Med* 10: 69–77. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26657976>. Accessed 7 April 2016. doi: [10.1586/17476348.2016.1121104](https://doi.org/10.1586/17476348.2016.1121104) PMID: [26657976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26657976/)
 15. Kern K, Glcock IR, Behr J (2013) Pulmonary rehabilitation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis—a review. *Respiration* 85: 89–98. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22942793>. Accessed 17 March 2016. doi: [10.1159/000354112](https://doi.org/10.1159/000354112) PMID: [22942793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22942793/)
 16. D'Arendse AD, Hesselink WA (1978) Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 3808–3812. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/PMC/articles/PMC3103078/>. Accessed 10 March 2013. PMID: [60759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/60759/)
 17. McLeod BF, Lawrence HJ, Smith DW, Vogt PJ, Ganders DR (1987) Fatal bleomycin toxicity from a low cumulative dose in a patient with renal insufficiency. *Cancer* 60: 2817–2820. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2445483>. Accessed 10 March 2013. PMID: [2445483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2445483/)
 18. Degryse AL, Lawson WE (2011) Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci* 341: 444–449. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21613632/>. Accessed 13 March 2013. doi: [10.1097/MAA.0b013e31821a0000](https://doi.org/10.1097/MAA.0b013e31821a0000) PMID: [21613632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21613632/)
 19. Pires LO, Oliveira FMS, Ribeiro TMS, Almeida PWM, Cardoso JA, et al. (2012) Exercise attenuates pulmonary injury in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Biol Med* (Maywood) 237: 873–883. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22903133>. Accessed 23 September 2015.
 20. Pereira PR, Oliveira-Junior MC, MacKenzie B, Chiovato JED, Miles Y, et al. (2016) Exercise Reduces Lung Fibrosis Involving Serotonin (5-HT) Signaling. *Med Sci Sport Exerc* 1. Available: http://content.sagepub.com/linkback/openurl?cid=WKPT3_P36dmgapaper-00006748-900000000-37575.
 21. Vieira RP, Duarte ACS, Claudino RC, Perini A, Santos ABQ, et al. (2007) Creatine supplementation exacerbates airway lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 660–667. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17541295>. Accessed 14 September 2015. PMID: [17541295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17541295/)
 22. Vieira RP, Claudino RC, Duarte ACS, Santos ABQ, Perini A, et al. (2007) Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 871–877. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17590332>. Accessed 3 August 2015. PMID: [17590332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17590332/)
 23. Keane MP (2008) The role of chemokines and cytokines in lung fibrosis. *Eur Respir Rev* 17: 151–156. Available: <http://www.erj.ersj.org/viewarticle/17/10/0511>. Accessed 4 April 2016.
 24. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lianhe S, Wang X, et al. (2001) Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β_1 . *J Exp Med* 194: 809–822. Available: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1094/jem.194.5.809>. Accessed 2 July 2016. PMID: [11540396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11540396/)
 25. Braggemann TR, Avila LCM, Fortkamp B, Gwillo FR, Bobinski F, et al. (2015) Effects of Swimming on the Inflammatory and Redox Responses in a Model of Allergic Asthma. *Int J Sports Med*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26053923>. Accessed 23 November 2015.
 26. Shin YS, Takada K, Gelfand EW (2009) Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol Rev* 1: 10–18. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2601565&loc=pmc-entrez&rendertype=abstract>. Accessed 4 August 2015. doi: [10.4161/aa.2009.1.1.10](https://doi.org/10.4161/aa.2009.1.1.10) PMID: [20224626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20224626/)
 27. Wiklund L, Herick SE, Summers A, Branchley PE, Hoff CM, et al. (2013) The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis Tissue Repair* 6: 18. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3840543&loc=pmc-entrez&rendertype=abstract>. Accessed 27 January 2014. doi: [10.1186/1745-1538-6-18](https://doi.org/10.1186/1745-1538-6-18) PMID: [24294331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24294331/)

28. Belperio JA, Dy M, Burdick MD, Xue YY, Li K, et al. (2012) Interaction of IL-13 and C10 in the Pathogenesis of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/200909>.
29. Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, Stanko K, Noble PW, et al. (2004) A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 350: 125–133. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711911>. Accessed 4 April 2016. PMID: 14711911
30. Collier DH, Rys JH, Douglas WW, Schwarz M, Cuman-Everett D, et al. (2004) Combined corticosteroid and cyclophosphamide therapy does not alter survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 125: 2169–2174. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189938>. Accessed 10 March 2013. PMID: 15189938
31. Papiris SA, Manali ED, Kollakos L, Kageouris K, Triantafyllidis C, et al. (2010) Clinical review: Idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations—unravelling Ariadne's thread. *Crit Care* 14: 248. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=290036&loc=abstract>. Accessed 11 April 2016. doi: 10.1186/cc9241 PMID: 21235829
32. Brinkner BD, Bean CP, Eubank TD, Marsh CB (2008) The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 10: 287–302. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=273771&loc=abstract>. Accessed 23 September 2015. PMID: 17981088
33. Pereira PR, Oliveira-Junior MC, MacKenzie B, Chiavato JED, Matsuyama Y, et al. (2016) Exercise Reduces Lung Fibrosis Involving Serotonin/ α_1 Signaling. *Med Sci Sports Exerc*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925325>. Accessed 23 February 2016.
34. Hala COW, Hyde DM, Ochs M, Waltherer (2010) An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 394–418. doi: 10.1164/rccm.200909-1522ST PMID: 20130146
35. Vainshelboim B, Fox BD, Kruiser MR, Ishikawa S, Gershman E, et al. (2016) Short-term Improvement in Physical Activity and Body Composition Following Supervised Exercise Training Program in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Arch Phys Med Rehabil*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925325>. Accessed 17 March 2016.
36. Hewitt M, Crael A, Esail K, Davis IC, Schiebeler LM (2009) Acute exercise decreases airway inflammation, but not responsiveness, in an allergic asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 85–89. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=260846&loc=abstract>. Accessed 14 September 2015. doi: 10.1165/ajrcm.2008-0172OC PMID: 19535813
37. Silva RA, Vieira RP, Duarte ACS, Lopes FDTOS, Perini A, et al. (2010) Aerobic training reverses airway inflammation and remodeling in an asthma murine model. *Eur Respir J* 35: 994–1002. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19897558>. Accessed 31 July 2015. doi: 10.1183/0950-2688.09040000 PMID: 19897558
38. Oliva CR, Vieira RP, Antunes-Costa FM, Perini A, Martins MA, et al. (2012) Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol* 182: 81–87. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22533287>. Accessed 4 December 2015. doi: 10.1016/j.resp.2012.05.004 PMID: 22533287
39. Ishida G, Brauer R (2003) IL-4 Is Not a Key Proinflammatory Cytokine in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis Model. *J Immunol* 171: 2767–2776. Available: <http://www.jimmunol.org/content/171/16/2767>. Accessed 7 April 2016.
40. Tsubota PG, Gargoularis KJ, Petrucci E, Germain A, Tsubota AG, et al. (2006) Cytokine levels in the sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 100: 938–945. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236430>. Accessed 7 April 2016. PMID: 16236430
41. Taniguchi H, Kato S, Kadota J, Matsubara Y, Fukushima K, et al. (2003) Interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in bronchoalveolar lavage fluid in interstitial lung disease. *Eur Respir J* 18: 959–964. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153599>. Accessed 7 April 2016. PMID: 11153599
42. Jakubick C, Choi ES, Kunkel SL, Evanoff H, Martinez FJ, et al. (2004) Augmented pulmonary IL-4 and IL-13 receptor subunit expression in idiopathic interstitial pneumonia. *J Clin Pathol* 57: 477–485. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1770235&loc=abstract>. Accessed 11 April 2016. PMID: 15113954
43. Munkley LA, Argentieri RL, Farnell FX, Bracht M, Shang H, et al. (2008) Hyper-responsiveness of IPF UIP fibroblasts: Interplay between TGF β 1, IL-13 and CCL2. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2174–2182. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325485>. Accessed 7 April 2016. doi: 10.1016/j.bbcel.2008.02.016 PMID: 18325485
44. Park S-W, Ahn M-H, Jang HK, Jang AS, Kim D-J, et al. (2009) Interleukin-13 and its receptors in idiopathic interstitial pneumonia: clinical implications for lung function. *J Korean Med Sci* 24: 614–620.

- Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191833>. Accessed 7 April 2016. doi: [10.3345/ajr.2009.244.A14](https://doi.org/10.3345/ajr.2009.244.A14) PMID: [19854941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19854941/)
45. Kolodick JE, Towse GB, Jakubick C, Hagaboom C, Moore TA, et al. (2004) Protection from fluoro-cobalamin-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts. *J Immunol* 172: 4068–4076. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034019>. Accessed 7 April 2016. PMID: [15034019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15034019/)
 46. Murray LA, Zhang H, Oak SR, Costello AL, Hensh A, et al. (2014) Targeting interleukin-13 with interleukin-13 antibodies attenuates lung fibrosis and epithelial damage in a humanized SCID idiopathic pulmonary fibrosis model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50: 985–994. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4288048&loc=pubmed>. Accessed 7 April 2016. doi: [10.1165/ajrmb.13-0342OC](https://doi.org/10.1165/ajrmb.13-0342OC) PMID: [24325475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24325475/)
 47. Brightling CE, Chanzy P, Leigh R, O'Byrne PM, Korn S, et al. (2015) Efficacy and safety of inhaled nintedanib in patients with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* 3: 692–701. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231286>. Accessed 7 April 2016. doi: [10.1016/S2213-2600\(15\)00197-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00197-8) PMID: [25231286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25231286/)
 48. Nishida Y, Matsubara T, Tobina T, Shindo M, Tokuyama K, et al. (2010) Effect of low-intensity aerobic exercise on insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding proteins in healthy men. *Int J Endocrinol* 2010. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20465765>. Accessed 7 April 2016. doi: [10.1155/2010/130342OC](https://doi.org/10.1155/2010/130342OC) PMID: [20465765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20465765/)
 49. Uh ST, Inoue Y, King TE, Chen ED, Newman LS, et al. (1998) Morphometric analysis of insulin-like growth factor-I localization in lung tissues of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1826–1835. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817718>. Accessed 4 April 2016. PMID: [9817718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9817718/)
 50. Wynne MW, Frankel SK, Riches DWH (2004) IL-4-induced macrophage-derived IGF-I protects myofibroblasts from apoptosis following growth factor withdrawal. *J Leukoc Biol* 76: 1019–1027. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15318031>. Accessed 7 April 2016. PMID: [15318031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15318031/)
 51. Kolb M, Margalit PJ, Anthony DC, Plossl F, Gauldie J (2001) Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107: 1529–1538. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=200198&loc=pubmed>. Accessed 10 March 2013. PMID: [11413180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11413180/)
 52. Wilson MS, Madala SK, Ramaningam TR, Gochuico BR, Rosas IC, et al. (2010) Bleomycin and IL-1beta mediate pulmonary fibrosis in IL-17A dependent. *J Exp Med* 207: 526–532. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=283214&loc=pubmed>. Accessed 7 April 2016. doi: [10.1084/jem.2009/2121](https://doi.org/10.1084/jem.2009/2121) PMID: [20174801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20174801/)
 53. Whittington HA, Armstrong L, Uppington KM, Miller AB (2004) Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 220–226. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039235>. Accessed 7 April 2016. PMID: [15039235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15039235/)
 54. Losa Garcia JE, Rodriguez FM, Martin de Cabo MR, Garcia Salgado MJ, Losa JP, et al. (1999) Evaluation of inflammatory cytokine secretion by human alveolar macrophages. *Mediators Inflamm* 8: 45–51. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1781790>. Accessed 11 April 2016. PMID: [10704082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10704082/)
 55. Park CS, Chung SW, KOSY, Um GI, Uh ST, et al. (2000) Increased levels of interleukin-8 are associated with lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluids of idiopathic non-specific interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1182–1188. Available: <http://www.ajrccm.org/doi/full/10.1164/ajrccm.162.3.99040078>. Accessed 11 April 2016. PMID: [10985147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10985147/)
 56. Whittington HA, Freeburn RW, Godinho SIH, Egan J, Halder Y, et al. (2003) Analysis of an IL-10 polymorphism in idiopathic pulmonary fibrosis. *Genes Immun* 4: 258–264. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761561>. Accessed 29 March 2016. PMID: [12761561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12761561/)
 57. Knäuper RL, Sakamoto H, Jain F, Zhao L-H, Hymowitz G, et al. (2004) IL-10 inhibits inflammation but does not affect fibrosis in the pulmonary response to bleomycin. *Exp Mol Pathol* 78: 205–211. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126102>. Accessed 29 March 2016. PMID: [15126102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15126102/)
 58. Nakagome K, Dohi M, Okumura K, Tanaka R, Miyazaki J, et al. (2006) In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung. *Thorax* 61: 885–894. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809410>. Accessed 23 September 2015. PMID: [16809410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16809410/)
 59. Lee CG, Homer RJ, Cohn L, Link H, Jung S, et al. (2002) Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucosal metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 277: 35488–35494. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12107190>. Accessed 11 April 2016. PMID: [12107190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12107190/)

60. Parumbi JG, Myers JL, Ryu JH (2005) Histopathologic features and outcome of patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis undergoing surgical lung biopsy. *Chest* 128: 3310–3315. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16304277>. Accessed 11 April 2016. PMID: 16304277
61. Salzman M, Camillo G, Estrada A, Mejia M, Becerra C, et al. (2007) Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One* 2: e462. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 11 April 2016. PMID: 17534432

8.13 ANEXO 13 – ACEITE DO TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO NO FORMATO DE PÔSTER NA EB 2019.



Erasmoo Assumpcao Neto <erasmo.neto@gmail.com>

Experimental Biology 2019 - Notification of Late-Breaking Abstract Presentation (ASBMB)

EB2019Abstracts@mirasmar.com <EB2019Abstracts@mirasmar.com>

28 de fevereiro de 2019 23:04

Para: erasmo.neto@gmail.com

Cc: fernanda.consolim@uninove.br, prof.kangelis@unif9.pro.br, rodrelena@yahoo.com.br

EXPERIMENTAL BIOLOGY 2019
ABSTRACT CONFIRMATION OF LATE-BREAKING POSTER PRESENTATION
Orange County Convention Center
Orlando, FL
April 8-9, 2019

Dear ERASMO ASSUMPCAO NETO,

Your abstract has been programmed in the following poster session. A copy of this email has been sent to co-authors and the abstract sponsor.

Abstract Submission ID Number: 9029

Abstract Title: Immune response mediated by NRLP3 expression in children infected with Respiratory Syncytial Virus

Presenting Author: ERASMO ASSUMPCAO NETO

POSTER PRESENTATION INFORMATION: (read carefully)

Programming Society : American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Poster Session Title: Signal Transduction and Cellular Regulation Late Breaking Research

Day of presentation: Tuesday, April 9, 2019

Poster Board Number: E466

Program Number: LB280

Authors must be present at their posters during the following poster manning times:

Sunday: ASBMB even boards present 12:15 - 1:00 p.m.; odd boards present 12:45 - 1:30 p.m.

Monday or Tuesday: ASBMB even boards present 11:45 a.m. - 12:30 p.m.; odd boards present 12:15 - 1:00 p.m.

Location: Convention Center, Exhibit Hall-West Hall B

POSTER PRESENTATION INFORMATION

Below are the set-up, presentation, and tear-down hours for your assigned Poster Session Day:

	Location	Poster Set-up	Poster Viewing	ASBMB Poster Presentation	Poster Tear-down
Sunday - Tuesday	Exhibit Hall	7am - 9am	9am - 4pm	See above for when you need to be standing at your board.	4pm - 6pm

. Prepare your poster for poster-board surface area 3'8" high and 7'8" wide.

. Poster presentation hours vary per Society.

. You are expected to stand at your poster board during the assigned Poster Presentation time to answer questions about your research.

. Do not leave your belongings, poster containers or any materials under the poster boards or in the poster area. EB Management is not responsible for articles left in the poster area. Pushpins are available onsite.

. Details for preparing your poster are available at [Poster Presentation Instructions](#).

ONLINE POSTER ACCESS

As an additional opportunity to gain exposure and interest in your research, all poster presenters are encouraged to upload a PDF of their poster to the EB e-poster site.

Following EB 2019, only registered attendees will be able to access PDFs of the posters through the e-poster link.

[Click here for information about uploading your poster](#)

FINANCIAL INFORMATION

<https://mail.google.com/mail/u/1/?ik=d35f3d3cc1&view=pt&search=all&permmsgid=msg-f%3A1626767033793642648&siml=msg-f%3A1626767...> 1/2

Housing, transportation, registration and any additional expenses are your responsibility unless you have been otherwise notified. If you have not already [registered](#) and made your [hotel reservation](#), please do so immediately.

REGISTRATION

All abstract presenters must [register](#) for the meeting unless you have been otherwise notified. The abstract submission fee does not include registration for the meeting. Apply for membership to receive significant savings off the non-member registration fees.

IMPORTANT LINKS

- . Recommended poster printing and delivery service - [Presentation Information](#) - [Poster Printing](#)
- . Poster preparation policies and tips - [Presentation Information](#) - [Poster Presentation Instructions](#)
- . Book your hotel through EB by March 13 - [Housing Information](#)
- . Registration fees increase after March 20 - [Registration Information](#)
- . Once you have registered, you can print your own letter of invitation, registration receipt, or email confirmation - [Registration Information](#) - [Registration Resource Center](#)
- . Attention International presenters - [Visa Information](#) - [Procedures for International Visitors](#) Note: Registration refunds will not be issued for denied visas after Monday, March 4, 2019.

Authors may [login](#) at any time to view their abstract scheduling information. Once logged-in click the "My Account" link in the black menu bar near the top right of the screen, then select "Email History".

QUESTIONS

If you have questions prior to the meeting, please contact the society that programmed your abstract: [American Society for Biochemistry and Molecular Biology](#).

We look forward to seeing you in Orlando!

Best regards,

EB2019 Management Team

Disclaimer

The information contained in this communication from the sender is confidential. It is intended solely for use by the recipient and others authorized to receive it. If you are not the recipient, you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution or taking action in relation of the contents of this information is strictly prohibited and may be unlawful.

This email has been scanned for viruses and malware, and may have been automatically archived by Mimecast Ltd, an Innovator in Software as a Service (SaaS) for business. Providing a safer and more useful place for your human generated data. Specializing in; Security, archiving and compliance. To find out more [Click Here](#).