MONIQUE BUTTIGNOL

Imunopatologia da lesão pulmonar causada pela infecção do H1N1

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Thais Mauad

**SÃO PAULO
2016**

MONIQUE BUTTIGNOL

Imunopatologia da lesão pulmonar causada pela infecção do H1N1

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Thais Mauad

**SÃO PAULO
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Buttignol, Monique

Imunopatologia da lesão pulmonar causada pela infecção do H1N1 / Monique
Buttignol. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Vírus da Influenza A subtipo H1N1 2.Síndrome do desconforto
respiratório do adulto 3.Lesão pulmonar 4.Alergia e imunologia 5.Imunidade inata
6.Imunidade adaptativa

USP/FM/DBD-201/16

Dedicatória

*Aos meus estimados pais, Marcos e Márcia,
a minha irmã Marina, e ao meu querido Ronnie, por serem meu porto seguro.*

Agradecimentos

A Profa. Dra. Thais Mauad, meu sincero agradecimento pela orientação desta dissertação de mestrado; pela incrível oportunidade nesses meus primeiros momentos no mundo da pesquisa científica. Muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos, experiências, e por me ensinar um novo olhar sobre o mundo.

A Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff e Prof. Dr. Luiz Fernando que muito contribuíram para que esta dissertação fosse realizada.

Aos queridos amigos que a patologia me presenteou, Raquel e Diogenes, pelos incontáveis ensinamentos, ricas discussões, conselhos, conversas e risadas. Com certeza a minha formação no mestrado teve um grande ganho por ter cruzado com vocês.

Ao amigo Ruy, que pacientemente ensinou e guiou as minhas primeiras construções científicas. Por sua generosidade nata, e ajuda incondicional em todas as horas, por ser capaz de me fazer compreender que o grande prazer do conhecimento está em transmiti-lo, tornando a minha trajetória no mestrado muito rica.

A todos os queridos colegas da sala 1155, pelos momentos de descontração e conversas, fazendo os dias no laboratório sempre tão singulares.

A todos os funcionários e técnicas dos laboratórios de Histologia, Imuno-histoquímica e Museu, em especial a Kelly, Ângela, Maria Cristina e Ana, por confeccionar e digitalizar os blocos e lâminas histológicas, necessárias para esta tese.

Aos funcionários, técnicos e patologistas do SVOC, aos médicos assistentes e residentes do Departamento de Patologia, por sua contribuição na coleta das amostras pulmonares para esta pesquisa.

Aos familiares, e indivíduos falecidos, que foram sujeitos desta pesquisa.

*'A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original'.
(Albert Einstein)*

Normas

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico dos vírus influenza associados às pandemias	1
1.2 O histórico da pandemia H1N1	2
1.3 Manifestações clínicas	4
1.3.1 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)	7
1.4 Dano Alveolar Difuso.....	8
1.5 Aspectos anatomopatológicos	9
1.6 Imunopatologia da resposta à infecção ao vírus da influenza.....	10
1.7 Justificativa do estudo.....	13
 2. OBJETIVO	 15
 3. MÉTODOS	 16
3.1 População do estudo.....	16
3.1.1 Grupo controle	16
3.1.2 Grupo SDRA	17
3.1.3 Grupo H1N1.....	17
3.2. Processamento tecidual	18
3.2.1 Imuno-histoquímica	19
3.2.2 Análise morfométrica.....	20
3.3 Análise estatística	22
 4. RESULTADOS	 23
4.1 Caracterização da população estudada	23
4.2 Análise morfométrica.....	27
4.2.1 Análise morfológica no parênquima pulmonar.....	27

4.2.1.1 Linfócito T CD8+ no parênquima pulmonar.....	29
4.2.1.2 Linfócito T CD4+ no parênquima pulmonar.....	30
4.2.1.2 Células NK (CD57+) no parênquima pulmonar.....	31
4.2.1.3 Célula dendrítica (CD83+) no parênquima pulmonar.....	32
4.2.1.4 Granzima A+ no parênquima pulmonar.....	33
4.2.1.5 Linfócitos B CD20+, granzima B, mastócitos e IL-17 no parênquima pulmonar.....	34
4.2.1.6 Foxp3 e CD207+ no parênquima pulmonar.....	34
4.2.2 Análise morfométrica das pequenas vias aéreas.....	35
4.2.2.1 Granzima A+ nas pequenas vias aéreas.....	36
4.2.2.2 Mastócito (triptase+) nas pequenas vias aéreas	37
4.2.2.3 Célula dendrítica de Langerhans (CD207+) nas pequenas vias aéreas.....	38
4.2.2.4 Célula dendrítica (CD83+) nas pequenas vias aéreas.....	39
4.2.2.5 IL-17 nas pequenas vias aéreas.....	40
4.2.2.6 Linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfócitos B CD20+, células NK (CD57+), mastócitos (quimase+), granzima B+ nas pequenas vias aéreas.....	41
4.2.2.7 Foxp3+ nas pequenas vias aéreas.....	41
4.2.3 Correlações morfológicas.....	41
5. DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	54

Apêndice

Lista de figuras

Figura 1.	Radiografia de Tórax de paciente do sexo feminino, RT-PCR positivo para A (H1N1)pdm09 apresentando infiltrado bilateral nos 2/3 inferiores.....	05
Figura 2.	Representação da análise morfométrica no parênquima alveolar.....	21
Figura 3	Representação da análise morfométrica na via aérea.....	22
Figura 4.	Fotomicrografias do parênquima pulmonar, nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Coloração hematoxilina e eosina.....	26
Figura 5.	Fotomicrografias das pequenas vias aéreas, nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Coloração hematoxilina e eosina.....	26
Figura 6.	Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle, SDRA e H1N1 com marcação imuno-histoquímica para células T CD8+.....	29
Figura 7.	Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle, SDRA e H1N1 com marcação imuno-histoquímica para células T CD4+.....	30
Figura 8.	Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle, SDRA e H1N1, com marcação imuno-histoquímica para células NK CD57+.....	31
Figura 9.	Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle, SDRA e H1N1 com marcação imuno-histoquímica para células dendríticas CD83+.....	32

Figura 10.	Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle, SDRA e H1N1 com marcação imuno-histoquímica para granzima A+.....	33
Figura 11.	Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1 com marcação imuno-histoquímica para granzimas A+.....	36
Figura 12.	Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1, com marcação imuno-histoquímica para mastócitos (triptase+).	37
Figura 13.	Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1 com marcação imuno-histoquímica para células dendríticas CD207+.....	38
Figura 14.	Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1, com marcação imuno-histoquímica para células dendríticas CD83+.....	39
Figura 15.	Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1, com marcação imuno-histoquímica para IL-17+.....	40

Lista de tabelas

Tabela 1.	Sinais de alerta clínico para a apresentação mais grave da influenza A(H1N1)pdm09.....	05
Tabela 2.	Fatores de risco para o desenvolvimento da forma grave da influenza A(H1N1)pdm09.....	06
Tabela 3.	Padronização de anticorpos para a análise imuno-histoquímica	19
Tabela 4.	Dados demográficos e principais causas de óbito entre os grupos do estudo.....	23
Tabela 5.	Dias de evolução, parâmetros ventilatórios, relação PaO ₂ /FiO ₂ e fatores predisponentes dos pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).....	24
Tabela 6.	Densidade celular no parênquima pulmonar em cada marcador nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	28
Tabela 7.	Densidade de células positivas nas vias aéreas em cada marcador nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	35

Lista de gráficos

Gráfico 1.	Densidade de células T CD8+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	29
Gráfico 2.	Densidade de células T CD4+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	30
Gráfico 3.	Densidade de células T CD57+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	31
Gráfico 4.	Densidade de células T CD83+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	32
Gráfico 5.	Densidade de granzima A+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	33
Gráfico 6.	Densidade de granzimas A+ nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	36
Gráfico 7.	Densidade de mastócitos (triptase+) nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	37
Gráfico 8.	Densidade de células dendríticas CD207+ nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	38
Gráfico 9.	Densidade de células dendríticas CD83+ nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	39
Gráfico 10.	Densidade de IL-17+ nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1.....	40

- Gráfico 11. Correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e linfócitos T CD8+ nas pequenas vias aéreas do grupo H1N1.....41
- Gráfico 12. Correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e linfócitos T CD4+ nas pequenas vias aéreas do grupo H1N1.....42
- Gráfico 13. Correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e IL-17+ no parênquima pulmonar do grupo H1N1.....42
- Gráfico 14. Correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e IL-17+ nas pequenas vias aéreas do grupo H1N1.....43

RESUMO

Buttignol M. *Imunopatologia da lesão pulmonar causada pela infecção do H1N1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Durante o inverno de 2009, o vírus influenza A(H1N1)09pdm surgiu e se espalhou globalmente. A infecção por este vírus pode induzir a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) em alguns pacientes. O dano alveolar difuso (DAD), padrão histopatológico principal da SDRA, tem etiologia multifatorial, sendo possível que a imunopatologia seja diferente nas várias apresentações do DAD. **Objetivo:** Descrever, quantificar e comparar a imunopatologia viral (influenza A (H1N1) pdm09) e não-viral em casos de autópsia com dano alveolar difuso. **Métodos:** Foram analisados tecidos pulmonares de autópsia de 44 pacientes, sendo divididos em 3 grupos: grupo H1N1 (n=15), caracterizado por DAD secundário à influenza A(H1N1)pdm09; grupo SDRA (n=13), caracterizado por pacientes com DAD exsudativo de causas não-pulmonares; e o grupo de controle (n=16) com indivíduos que faleceram de causas não-pulmonares. Foram utilizadas as técnicas de imunohistoquímica e análise de imagem para quantificar, no parênquima pulmonar e nas pequenas vias aéreas, os marcadores de células imunes. **Resultados:** Foi observada uma elevada densidade celular de linfócitos T CD4+ e T CD8+, células Natural Killer CD57+, células dendríticas CD83+ e granzima A+ no parênquima pulmonar do grupo H1N1 ($p<0,05$) em relação aos outros grupos. Na análise das pequenas vias aéreas, observou-se uma menor densidade celular de mastócitos (triptase), células dendríticas (CD207), e um aumento de IL-17 nos grupos H1N1 e SDRA, além de um aumento do número de granzimas A+ e diminuição de células dendríticas (CD83) apenas no grupo H1N1 ($p<0,05$). **Conclusão:** O DAD causado pelo vírus influenza A (H1N1) pdm09 está associado com um fenótipo citotóxico inflamatório diferente do DAD de causas não-virais, com uma resposta parcialmente divergente no parênquima pulmonar em relação às pequenas vias aéreas.

Descritores: vírus da influenza A subtipo H1N1; síndrome do desconforto respiratório do adulto; lesão pulmonar; alergia e imunologia; imunidade inata; imunidade adaptativa.

SUMMARY

Buttignol M. *Immunopathology of the infection caused by H1N1* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Rationale: The pandemic influenza A (H1N1) virus emerged in 2009 and spread globally. This virus infection can induce acute respiratory distress syndrome (ARDS) in some patients. Diffuse alveolar damage (DAD), which is the histological surrogate for ARDS, has a multifactorial etiology. Therefore, it is possible that the immunopathology differs among the various presentations of DAD. **Objectives:** To compare the lung immunopathology of viral (influenza A(H1N1)pdm09) to non-viral, extrapulmonary etiologies in autopsy cases with DAD. **Methods:** The lung tissue of 44 patients, was divided into 3 groups: the H1N1 group (n=15) characterized by DAD due to influenza A(H1N1)pdm09 infection; the ARDS group (n=13), characterized by patients with exudative DAD due to non-pulmonary causes; and the control group (n=16), consisting of patients with non-pulmonary causes of death. **Measurements and main results:** Immunohistochemistry and image analysis were used to quantify, in the lung parenchyma and small airways, several immune cell markers. There was higher expression of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, CD83+ dendritic cells, granzyme A+ and natural killer+ cell density in the lung parenchyma of the H1N1 group ($p<0,05$). In the small airways, there was a lower cell density of tryptase+ mast cells and dendritic+ cells and an increase of IL-17 in both DAD groups, with an increased number of granzyme A in H1N1 group ($p<0,05$). **Conclusion:** DAD due to viral A(H1N1)pdm09 is associated with a cytotoxic inflammatory phenotype that is different from non-viral causes of DAD, with partially divergent responses in the parenchyma relative to the small airways.

Descriptors: influenza A virus, H1N1 subtype; acute respiratory distress syndrome; lung injury; allergy and immunology; immunity, innate; adaptive, immunity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico dos vírus Influenza associados às pandemias

Os vírus da influenza estão entre as causas mais comuns de infecções respiratórias em humanos, e entre as mais significativas, por também estarem associados a alta morbidade e mortalidade (1).

Nos últimos 500 anos, desde 1510, houve cerca de catorze pandemias por vírus influenza A sendo as principais ocorridas em 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 e 2009 (2). A pandemia de 1918, denominada "Gripe Espanhola", foi considerada a pior da história, causando aproximadamente 50 milhões de mortes em todo o mundo (3). O impacto dessa pandemia não se limitou aos anos de 1918-1919. Todas as pandemias de gripe A, desde aquela época e quase todos os casos de gripe A em todo o mundo, tem sido causados por descendentes do vírus H1N1 de 1918 (incluindo os rearranjos H2N2 e H3N2) (4). A segunda pandemia do século XX ocorreu em 1957, e foi chamada de "Gripe Asiática". Neste período o H1N1 adquiriu três dos seus oito genes de um vírus aviário e, com isso, o recém-formado H2N2, que ainda carregava grande parte do H1N1, infectou milhões de pessoas em todo o mundo. O H2N2 substituiu o H1N1 por pelo menos onze anos (5) (6).

A terceira pandemia do século XX ocorreu em 1968 e ficou conhecida como "Gripe de Hong Kong". Essa pandemia foi causada pelo vírus H3N2 que, ainda, carregava genes do H1N1 de 1918. Em 1977 houve a reemergência do H1N1 que do ponto de vista genético, guardava relação íntima com o H1N1 que circulava em 1950; essa reemergência se deu graças à liberação acidental de uma amostra do H1N1 isolado na Escandinávia em 1950 que estava

armazenado em laboratório (7). Portanto, foi o rearranjo do H3N2 de 1968 com duas linhagens de H1N1, ambas derivadas do vírus suíno de 1918, que deram origem ao H1N1 de 2009 (5).

1.2 O histórico da pandemia H1N1

O inverno de 2009 foi marcado pelo surgimento de um novo subtipo do vírus da influenza A, subtipo H1N1 (A(H1N1)pdm09), que foi identificado em março do mesmo ano no México e rapidamente foi relatado circulante em praticamente todos os países do mundo (8).

Em junho de 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) formalizou a ocorrência de uma nova pandemia de influenza após um hiato de 40 anos. No mês de julho do mesmo ano, mais de 94.000 casos foram confirmados e reportados por 100 países diferentes (9) e desde então o vírus influenza A(H1N1)pdm09 continua a circular com um comportamento sazonal (10). Estima-se que em doze meses, a partir do início da pandemia, cerca de 284.000 mortes ocorreram (11).

No Brasil, as ações preventivas para retardar a entrada do vírus no país tiveram início em abril de 2009, e em julho de 2009, o Ministério da Saúde admitiu oficialmente a existência de sua transmissão sustentada no território brasileiro (9). Até a semana epidemiológica (SE) 47 daquele ano foram confirmados 30.055 casos de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) por algum vírus influenza. A proporção de influenza A(H1N1)pdm09 foi de 93% (27.850/30.055) e de influenza sazonal foi de 7% (2.205/30.055). Este padrão foi similar ao observado pela Rede Global de Vigilância de Influenza da OMS, que registrou 93% de influenza pandêmica entre todos os vírus de influenza

monitorados no mundo nesta época, conforme foi notificado pelo Ministério da Saúde, em dezembro de 2009 (12).

A taxa de incidência de SRAG, pelo A(H1N1)pdm09 no Brasil foi de 14,5 casos para cada 100 mil habitantes, em 2009. No entanto, observou-se que a pandemia afetou com maior intensidade as regiões sul e sudeste (66,2/100.000 e 9,7/100.000 habitantes respectivamente). A taxa nacional de mortalidade por influenza pandêmica em 2009 foi de 0,85/100.000 habitantes, também com maiores taxas observadas nos estados das regiões sul e sudeste. Entre os 27.850 casos de SRAG confirmados de influenza pandêmica, 1.632 (5,8%) evoluíram para óbito, segundo o Informe Técnico emitido pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (13).

Em de agosto de 2010, a OMS declarou o início da fase pós-pandêmica do A(H1N1)pdm09, afirmando que os casos vinham sofrendo declínio global esperando-se assim que o vírus passasse a assumir o comportamento de um vírus da gripe sazonal e continuasse a circular por alguns anos world (14).

Segundo o último informe de influenza publicado pela OMS os vírus influenza continuam a circular em níveis elevados em todo o mundo (15), sendo o vírus influenza A (H1N1)pdm09 o prevalente nas regiões temperadas, e o principal causador de internações hospitalares graves, sendo necessários cuidados em unidades de terapia intensiva (UTI) com predomínio da forma grave da doença em adultos de meia-idade (16).

Passados seis anos da fase pandêmica do A(H1N1)pdm09, um novo surto de casos vem sendo observado no Brasil, com 411 mortes confirmadas até a semana epidemiológica 17 de 2016. Neste mesmo período, foram notificados 8600 casos de SRAG, com amostras processadas, destas, 29,0%

foram classificadas como SRAG por influenza e 5,7% como outros vírus respiratórios. Dentre os casos de influenza 84,5% eram influenza A(H1N1)pdm09, 10,1% influenza A não subtipado, 4,8% influenza B e 0,6% influenza A(H3N2). Os casos de SRAG por influenza apresentaram uma mediana de idade de 38 anos, variando de 0 a 99 anos. Do total de óbitos notificados, por SRAG (1643), 27% foram confirmados para vírus influenza, sendo 92,6% decorrentes de influenza A(H1N1)pdm09, 5,2% influenza A não subtipado, 2% por influenza B e 0,2% influenza A(H3N2). O estado com o maior número de óbitos por influenza foi São Paulo, totalizando 47,7% do país (17).

1.3 Manifestações clínicas

Os principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes infectados pelo A (H1N1)pdm09 são semelhantes aos da gripe sazonal: febre, com temperaturas elevadas (38°C), tosse e dispneia sendo que até 20% destes pacientes podem evoluir com a forma mais grave desenvolvendo pneumonia severa, necessitando de internação em UTI (18) (19).

Esta forma de apresentação mais grave da infecção viral, na maioria dos pacientes, tem instalação rápida com a presença de febre, tosse, dispneia, dificuldade respiratória, altos níveis de desidrogenase láctea e sinais de pneumonia bilateral na imagem de radiografia de tórax (figura1) (20).

Figura 1: Radiografia de Tórax de paciente do sexo feminino, 23 anos, obesa (IMC 31 kg/m), RT-PCR positivo para A (H1N1)pdm09 (início dos sintomas em sete dias) apresentando infiltrado bilateral nos 2/3 inferiores (20).

A OMS definiu os sinais de alerta clínico para as apresentações mais graves da influenza A(H1N1)pdm09, conforme listado na Tabela 1 (21).

Tabela 1. Sinais de alerta clínico para a apresentação mais grave da influenza A(H1N1)pdm09

-
- Dispnéia durante atividade física ou em repouso
 - Cianose
 - Expectoração sanguinolenta ou de outra cor
 - Estado mental alterado
 - Febre alta > 3 dias
 - Hipotensão
 - Em crianças incluem-se a taquipneia ou dispneia, sonolência, pouca ou nenhuma vontade de brincar
-

Durante a pandemia de 2009 houve um grande número de internações de indivíduos jovens que não apresentavam comorbidades associadas, atestando assim o potencial patogênico do A(H1N1)pdm09 em seres humanos (18) (19).

Em uma série de casos de autópsias nos EUA, a idade média dos pacientes foi de 36 anos, sendo 51% do sexo masculino. Os sinais e sintomas

mais frequentes foram falta de ar, febre e tosse. A obesidade (46%) foi o fator de risco mais prevalente. A ventilação mecânica invasiva foi utilizada em 74% dos casos. O diagnóstico de pneumonia esteve presente em 59% dos casos (22).

Mauad et al. relataram as características clínicas de 21 pacientes que foram a óbito pelo A(H1N1)pdm09, em São Paulo. A idade média dos pacientes foi 34 anos, e 57% deles eram homens. Todos tiveram a doença grave de instalação rápida caracterizada por falta de ar, febre, tosse e mialgia principalmente. Mais da metade deles tinham alguma comorbidade, sendo a doença cardiovascular a de maior prevalência. A maioria dos pacientes necessitou de ventilação mecânica invasiva e em 71% dos casos o diagnóstico clínico de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) foi estabelecido (23). Além disso, em outras regiões a presença de SDRA foi responsável por cerca de 49-72% das internações em UTI no ano de 2009.(19) (24).

Na tabela 2 encontram-se os principais fatores de risco para o desenvolvimento da forma grave da doença (20).

Tabela 2. Fatores de risco para o desenvolvimento da forma grave da influenza A(H1N1)pdm09

-
- Doenças respiratórias (por exemplo, asma, DPOC, bronquiectasia, pulmão cirurgia)
 - Obesidade
 - Gravidez
 - Tabagismo
 - Diabetes Mellitus
 - Doenças Cardiovasculares Crônicas
 - Doença Renal
 - Imunossupressão
 - Atraso no início da terapia antiviral
-

1.3.1 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)

A infecção severa pelo influenza A (H1N1)pdm09 pode induzir a SDRA, associado a presença de bronquiolite e hemorragia (23). A primeira descrição oficial da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) foi realizada por Ashbaugh et al, em 1967, caracterizada por um quadro de instalação aguda de dispneia, taquipneia, cianose refratária a oxigenioterapia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrado alveolar difuso identificada na radiografia de tórax (25).

Em 2012 foi proposta uma nova definição para a SDRA. Segundo esta nova definição o paciente é categorizado como tendo SDRA quando apresentar os seguintes fatores:

a) Quadro de instalação aguda, isto é, presença de um fator desencadeador provável em de 7 dias antes do quadro de SDRA ou reconhecimento da piora respiratória neste mesmo período;

b) Imagens radiológicas de tórax (radiografia ou tomografia computadorizada) com opacidades bilaterais não totalmente explicáveis por insuficiência cardíaca ou excesso de fluidos e;

c) PEEP de pelo menos 5 cmH₂O.

Nesta nova definição, os pacientes são categorizados de acordo com a gravidade da lesão:

- 1) Leve ($200 < \text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$ com PEEP ou CPAP $\geq 5\text{cmH}_2\text{O}$);
- 2) Moderada ($100 < \text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 200$ com PEEP $\geq 5\text{cmH}_2\text{O}$) e;
- 3) Grave ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 100$ com PEEP $> 5\text{cmH}_2\text{O}$) (26).

1.4 Dano alveolar difuso

A manifestação histológica característica na SDRA é o dano alveolar difuso (DAD) (27). O DAD é a lesão difusa do tecido alveolar, comprometendo o compartimento epitelial, endotelial e intersticial, podendo resultar em remodelamento tecidual (28). Em um estudo recente, o dano alveolar difuso esteve presente em 45% das autópsias nos pacientes com critérios para SDRA e foi predominante nos casos de SDRA grave (58%), segundo os critérios de Berlim (29).

As alterações histológicas da SDRA podem ser agrupadas em três fases sequenciais, porém sobrepostas: fase exsudativa, proliferativa e de fibrose (28). Na fase exsudativa, os alvéolos contêm fluido proteináceo, hemácias, neutrófilos e macrófagos. O edema e os neutrófilos acumulam-se no interstício e as membranas hialinas formam-se nos ductos alveolares. A fase exsudativa evolui para a fase proliferativa, sendo caracterizada por hiperplasia dos pneumócitos tipo II, acúmulo de fibroblastos e numerosos monócitos no interstício pulmonar. As células mesenquimais, em particular fibroblastos e miofibroblastos intersticiais, migram, replicam e secretam proteínas da matriz extracelular, como o colágeno. Esse processo pode levar ao estabelecimento de fibrose intersticial e intra-alveolar que caracteriza a fase fibrótica. A evolução para a fibrose pulmonar ocorre pelo reparo inadequado em resposta à lesão pulmonar e é vista como resultado da interação entre miofibroblastos, fibroblastos, células inflamatórias agudas e células epiteliais com citocinas, fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônia e fibrina (30) (31).

O DAD ocorre por diferentes causas como infecção bacteriana ou viral e sepsis entre outras. Sua classificação, de acordo com a etiologia, pode ser

dividida em dois grupos: de causa primária, direta ou pulmonar, na qual o dano atinge diretamente o parênquima pulmonar (pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico, contusão pulmonar e lesão inalatória), ou secundária, indireta ou extrapulmonar, onde ocorre uma resposta inflamatória sistêmica aguda (sepse, trauma, pancreatite) (30) (32) (33).

1.5 Aspectos anatomopatológicos

As infecções graves causadas pelos vírus influenza caracterizam-se geralmente por lesões do trato respiratório inferior. Mauad et al. descreveram pela primeira vez as alterações encontradas em autópsias de pacientes que faleceram pelas formas graves do A(H1N1)pdm09 (23). Posteriormente, outras séries americanas também relataram as mesmas alterações histológicas descritas nos casos brasileiros (22) (34) .

As lesões descritas nos pacientes da pandemia de 2009 foram semelhantes às lesões descritas em pandemias anteriores. Os principais achados foram:

1. Traqueíte e bronquite necrotizantes e com extensas áreas de metaplasia escamosa do epitélio respiratório;
2. As pequenas vias aéreas mostram acometimento inflamatório extenso, por vezes de caráter purulento e necrotizante. Alterações citopáticas de caráter viral são observadas no epitélio;
3. Nos septos alveolares observa-se extensa necrose de epitélio alveolar, com formação de membranas hialinas, hiperplasia de pneumócitos adjacentes, infiltrado intersticial composto de linfócitos e plasmócitos,

hemorragia intra-alveolar e graus variáveis de hemorragia alveolar, caracterizando um quadro de dano alveolar agudo .

Com apresentação de três padrões principais de lesão: casos com predominância de bronquiolite necrosante, casos com hemorragia alveolar extensa e casos com padrão de dano alveolar difuso exsudativo. Além disso, através da técnica de imunohistoquímica, foi observado que o vírus infecta as células epiteliais alveolares e as células das vias aéreas (23).

1.6 Imunopatologia da resposta à infecção ao vírus da influenza

A infecção pelo vírus influenza se inicia no trato respiratório superior, podendo ser contida neste órgão. Porém, este vírus pode penetrar no hospedeiro através das cavidades oral ou nasal, sendo combatido inicialmente pelo muco que cobre o epitélio respiratório. Se for capaz de prosseguir, atravessará a camada de muco e invadirá as células epiteliais respiratórias (35).

Após a adesão nas células no trato respiratório superior, o vírus replicará podendo se espalhar nos linfonodos regionais, e nas células do trato respiratório inferior induzindo a pneumonia e SDRA. Logo no início as células do sistema imune inato que estão circulantes, como os monócitos/macrófagos, granulócitos, neutrófilos e células natural killer (NK) serão ativados, afim de evitar que o vírus se espalhe (36).

O sistema imune inato forma a primeira linha de defesa do organismo contra as infecções pelo vírus da gripe, e é constituído, por exemplo, pelo muco, colectinas e diversas células que visam prevenir a infecção das células epiteliais respiratórias e a replicação do vírus (37).

O sistema imune inato detecta as infecções virais através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O vírus influenza é reconhecido pelas células do sistema imune inato, por pelo menos três classes distintas de receptores de reconhecimento padrão (PRRs): receptores tipo Toll (TLRs), ácido retinóico de gene indutível I (RIG-I) e a família de receptores NOD-like (38).

A extensão da resposta imune inata ao vírus e o quanto que ela pode contribuir para a lesão pulmonar, não é plenamente conhecida. O desfecho ótimo de uma infecção viral é aquele em que o sistema imune inato age para não haver disseminação da infecção, e estimule a resposta do sistema imune adaptativo para a eliminação do agente (37). A resposta imune inata é regulada por citocinas e quimiocinas produzidas pelas células epiteliais e leucócitos (macrófagos, células NK), além das células produtoras de interferon (IFNs) (IFN- α/β), como as células dendríticas plasmocitóides, macrófagos e pneumócitos (35).

As células NK desempenham papel importante por serem capazes de reconhecer e destruir células infectadas por diversos tipos de vírus e tumores, através de suas potentes ações citotóxicas, e robusta produção de citocinas inflamatórias como o IFN γ , TNF α e MIP-1. No entanto, seu papel no controle do vírus influenza A ainda permanece relativamente pouco estudado (37) (39).

Os mastócitos são células que estão amplamente distribuídas em superfícies mucosas e constituem um importante papel no sistema imune inato. Possuem diversos atributos, entre eles a elevada capacidade de detectar agentes patogênicos, sendo um dos primeiros respondedores à colonização do patógeno. Após sua ativação, a resposta imediata é caracterizada pela

liberação de histamina, serotonina, triptases, quimases e $\text{TNF-}\alpha$ (40). As células dendríticas são consideradas as principais células apresentadoras de antígenos em infecções virais. Encontram-se abaixo da barreira do epitélio das vias aéreas e acima da membrana basal. Elas são capazes de processar os antígenos e associá-los às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (37).

Os antígenos virais capturados no exterior das células são processados e unidos ao MHC-II e apresentados aos linfócitos T auxiliares (T CD4+), enquanto os antígenos virais produzidos dentro das células dendríticas são unidos ao MHC-I e apresentados aos linfócitos T citotóxicos (T CD8+). Assim, as células dendríticas constituem o principal elo entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo (37) (38).

O sistema imune adaptativo forma a segunda linha de defesa contra a infecção pelo vírus da gripe. É constituído pela imunidade humoral, mediada por anticorpos específicos contra o vírus e pela imunidade celular, mediada pelas células T (37) (38).

Vários tipos celulares da resposta imune adaptativa estão envolvidos no *clearance* ao vírus da influenza. Uma das principais células efetoras é o linfócito T CD8+, cuja ação citolítica se dá pela liberação das proteínas granzima e perforina e pela liberação de citocinas antivirais como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{INF}\gamma$. No entanto, estas substâncias também podem contribuir para a lesão pulmonar (36) (41).

Os linfócitos T CD4+ são importantes por sua habilidade em ajudar os linfócitos B na produção de anticorpos antivirais. Estes linfócitos parecem agir

principalmente nos órgãos linfóides locais ou regionais, como os BALTs (36) (41).

Os linfócitos podem ter papéis não só estimulatórios, mas também regulatórios da resposta inflamatória. O Foxp3+ e o CD25+, por exemplo, são um tipo especializado de células T CD4+ capazes de limitar as respostas imunes excessivas (42).

Os linfócitos citotóxicos e as células NK produzem as granzimas, que são serino-proteases, e tradicionalmente conhecidas por provocar a apoptose em células tumorais e células infectadas por vírus. Porém, em estudos com camundongos, a granzima B, no meio extracelular, apresentou uma ação de degradação das proteínas da matrix extracelular, como fibronectina e decorina, causando danos ao tecido (43).

Na pandemia de 2009, os pacientes que apresentaram as formas graves da doença mostraram alterações importantes do sistema imune inato e adaptativo. Os pacientes com as formas leves e graves da doença apresentaram níveis elevados de citocinas do sistema imune como IP-10, MCP-1, MIP-1 β , mas somente os pacientes com as formas graves apresentaram altos níveis sistêmicos de IFN γ e um grupo de mediadores envolvidos no desenvolvimento de respostas do tipo T-helper 17 (IL-8, IL-9, IL-17, IL-6) e T-helper 1 (TNF α , IL-15, IL-12) (44).

1.7 Justificativa do estudo

Embora a OMS tenha detectado o final da pandemia, a doença tem ainda causado fatalidades em diversos países do mundo, especialmente nos meses de inverno. Desta forma, é importante compreender o fenótipo

inflamatório pulmonar nestes casos mais graves. Este conhecimento pode colaborar com o entendimento dos mecanismos que culminam na lesão viral grave, oferecendo mais substratos para melhores estratégias de prevenção de pandemias futuras e tratamentos adjuvantes.

Até o presente momento, existem poucos estudos que abordaram os aspectos imunes do tecido pulmonar em pacientes que desenvolveram a forma grave da doença, com a presença do dano alveolar difuso (DAD) de causa viral, inclusive de causa não viral. A maioria dos estudos que enfocam os aspectos imunes são experimentais ou estudaram a resposta inflamatória sistêmica.

No presente trabalho, caracterizamos a resposta inflamatória imunológica no parênquima pulmonar e nas pequenas vias aéreas de pacientes que faleceram decorrentes da infecção viral pelo A (H1N1)pdm09, com DAD constatado na autópsia. Além disso comparamos esses casos com 2 grupos, um grupo com SDRA não viral de causa extrapulmonar, e um grupo controle, com indivíduos que faleceram de causas não-pulmonares, afim de se estabelecer quais os aspectos específicos da lesão pulmonar por A(H1N1)pdm09.

Nossa hipótese inicial era que o DAD de origem viral poderia estar associado com a presença de células citotóxicas, que não estariam presentes no DAD de causa não viral, com uma apresentação diferente dessas células nas pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar, sendo possível ainda que existissem um menor número de células T regulatórias nos pulmões destes pacientes com DAD comparados a um grupo controle.

2. OBJETIVOS

1. Descrever, quantificar e comparar a densidade celular de linfócitos T CD8 e T CD4, linfócitos B (CD20), células NK (CD57), granzima A e B, mastócitos (quimase e triptase), células dendríticas (CD83), células T regulatórias (foxp3), e IL-17, no parênquima e nas pequenas vias aéreas de pacientes que faleceram pela infecção da influenza A (H1N1)pdm09 com DAD, com pacientes que faleceram com DAD de causa não viral e com pacientes sem lesão pulmonar.

2. Investigar a existência de correlações entre linfócitos linfócitos T CD8 e T CD4, linfócitos B (CD20), células NK (CD57), granzima A e B, mastócitos (quimase e triptase), células dendríticas (CD83), células T regulatórias (foxp3), e IL-17, no parênquima e nas vias aéreas de pacientes que faleceram pela infecção da influenza A (H1N1)pdm.

3. MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa local (CAPPesq- HCFMUSP – nº 411/12).

3.1 População de estudo

O material deste estudo foi selecionado a partir de uma pesquisa retrospectiva do arquivo de autópsias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). As autópsias foram realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), ligado ao Departamento de Patologia da FMUSP, com finalidade diagnóstica durante o período de 2002 a 2010.

As autópsias selecionadas foram divididas em três grupos de indivíduos: grupo controle, grupo SDRA e grupo H1N1.

3.1.1 Grupo controle

Indivíduos que faleceram de causas não-pulmonares, que não apresentavam história prévia de doenças pulmonares e que não foram submetidos a ventilação artificial. Autópsia sem evidências macroscópicas ou histológicas de alterações pulmonares.

Os indivíduos deste grupo foram caracterizados a partir da análise do prontuário médico e a partir das informações contidas em um questionário respondido por familiares no SVOC, quando o óbito ocorreu fora do Hospital das Clínicas da FMUSP. Foram registrados: idade, sexo e causa de óbito.

3.1.2 Grupo SDRA

Foram incluídos no grupo SDRA pacientes provenientes do HC-FMUSP na última internação, que apresentaram:

- 1) Diagnóstico de SDRA de acordo com a definição de Berlim (26);
- 2) Alterações histológicas consistentes com SDRA em fase exsudativa e/ou fibro-proliferativa: evidências de alteração de permeabilidade da barreira alvéolo-capilar (hemorragia, edema, membrana hialina), infiltrado inflamatório (neutrófilos e células mononucleares), alterações consistentes com processo de reparação (tecido de granulação, fibrose) (31);
- 3) SDRA de origem não viral e de etiologia extra-pulmonar;
- 4) Ausência de doença pulmonar crônica prévia.

A caracterização dos pacientes deste grupo foi realizada a partir da análise dos prontuários médicos. Foram registrados: idade, sexo e causa predisponente de SDRA.

3.1.3 Grupo H1N1

Foram selecionados para este grupo os pacientes provenientes da grande São Paulo que faleceram pela infecção do vírus influenza A(H1N1)pdm09 durante a pandemia de 2009. Todos os pacientes apresentaram diagnóstico de infecção viral por A(H1N1)pdm09, confirmada em esfregaços de nasofaringe, usando o tempo real da transcriptase reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR), em conformidade com

as diretrizes dos Centros para Controle e Prevenção de Doenças Americana (CDC). Além disso, os fragmentos de pulmão deste grupo, foram encaminhados para investigação microbiológica utilizando o RT-PCR, no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo. A detecção e diferenciação da gripe sazonal e da influenza A(H1N1)pdm09 A foi feita através do protocolo instituído pelo CDC (23).

Os indivíduos deste grupo foram caracterizados a partir da análise do prontuário médico e Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde. Foram coletadas informações sobre os dados demográficos, condições médicas preexistentes, apresentação da doença viral e evolução até a morte (23).

3.2 Processamento tecidual

O tecido pulmonar foi coletado na rotina de autópsias do Departamento de Patologia da FMUSP. Fragmentos de tecido coletados nas áreas mais comprometidas do pulmão (nos grupos SDRA e H1N1) foram fixados em formaldeído tamponado a 10% por 24 a 48 horas e submetidos a processamento histológico habitual, sendo armazenados em blocos de parafina.

A partir dos blocos de parafina, foram realizados cortes de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (H&E) para o diagnóstico histológico de DAD no grupo SDRA ou H1N1 ou ausência de alterações pulmonares no grupo controle.

3.2.1 Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi utilizada para a identificação das proteínas CD4, CD8, CD20, CD57, CD83, CD207, quimase e triptase de mastócitos, IL17, Foxp3, granzima A e granzima B (45).

Inicialmente a parafina dos cortes foi removida com xilol. A peroxidase endógena bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,5% e metanol por 10 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos a recuperação antigênica e incubados de um dia para outro em câmara úmida com os seguintes anticorpos primários: CD4, CD8, CD20, CD57, CD83, CD207, quimase e triptase de mastócitos, IL17, Foxp3 granzima A e granzima B (tabela 3).

O complexo biotina-estreptavidina LSAB (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi utilizado após os anticorpos primários. Controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por um anticorpo controle de mesmo isotipo e com a substituição do anticorpo primário por solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS).

Tabela 3. Padronização de Anticorpos para a análise imuno-histoquímica

Anticorpo	Pré-tratamento	Clone	Diluição	Origem
CD4	citrato	aB12	1:200	Novocastra, Benton Lane/ United Kingdom
CD20	citrato	L 26	1:20.000	Dako, Glostrup/ Denmark
Quimase	citrato	cc1	1:5000	Novocastra, Benton Lane/ United Kingdom
Triptase	citrato	AA1	1:20.000	Dako, Glostrup/ Denmark
Foxp3	citrato	236A/E7	1:200	Abcam, Cambridge / United Kingdom
CD57	citrato	TB01	1:200	Dako, Glostrup/ Denmark

continua

				<i>continuação</i>
				Abcam, Cambridge / United Kingdom
CD207	citrato	12D6	1:600	
IL 17	citrato	policlonal	1:3000	R&D, Minneapolis / USA
Granzima B	citrato	policlonal	1:4000	Spring Bioscience, California/ USA
CD8	citrato	C8/144B	1:400	Dako, Glostrup/Denmark
CD83	tris-citrato	1H4B	1:100	Vector Laboratories, California/ USA
				Sanquim, Plesmanlaan / Amsterdam
Granzima A	citrato	GA - 6	1:100	

3.2.2 Análise morfométrica

Uma a três lâminas de cada paciente, contendo área de parênquima alveolar e com pequenas vias aéreas foram selecionadas e escaneadas (Panoramic scan, 3DHISTECH, Budapest, Hungary). Utilizando-se o mesmo programa, a análise do parênquima alveolar foi realizada selecionando aproximadamente 20 campos em cada lâmina/caso. Para cada campo selecionado utilizou-se um aumento de 500x, cobrindo uma área capaz de conter 1000 µm de comprimento de septo alveolar. Para a análise das vias aéreas foram selecionadas de duas a quatro pequenas vias aéreas pequenas (perímetro ≤ 6 mm da sua membrana basal) por paciente com uma ampliação de 500x (46).

Completada essa fase, as imagens dos campos foram visualizadas utilizando o software Image-Pro Plus 4.1 para Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA. 2008). A densidade celular do parênquima pulmonar foi verificada realizando-se a contagem de células coradas positivamente contidas em 1000 µm de comprimento de septo alveolar em cada campo (figura 2), sendo essas células divididas pelo perímetro do septo alveolar analisado

(cell/ μm). Para cada caso em cada marcador realizamos a média da densidade celular obtida dos 20 campos analisados.

Figura 2. Representação da análise morfométrica no parênquima alveolar. Em destaque o septo alveolar selecionado correspondendo a um perímetro de 1000 μm (tracejado vermelho), e células positivas (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 50 μm .

A densidade celular das pequenas vias aéreas foi verificada realizando a contagem das células coradas positivamente contidas em toda a extensão da via aérea, e essas células coradas foram divididas pelo perímetro da membrana basal (cell/ μm). Para cada caso em cada marcador realizamos a média da densidade celular obtida nas vias aéreas analisadas (figura 3).

Todas as lâminas com marcação IHQ foram codificadas, evitando que o grupo de estudo (Controle, SDRA e H1N1) fosse identificado pelo investigador (análise cega)

Figura 3. Representação da análise morfométrica na via aérea. Em destaque a membrana basal selecionada correspondendo a um perímetro de 1660 µm (tracejado vermelho), e células positivas (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100µm.

3.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software de estatística SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, EUA) e GraphPad Prism 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Após testar a distribuição de dados, a análise de variância 'One way ANOVA' foi usada para comparar os dados entre os grupos Controle, SDRA e H1N1 com pós teste de "Bonferroni". Para a associação entre as densidades celulares foi utilizado o teste de Spearman. Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil, quando apropriado. O nível de significância estabelecido para todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da população estudada

Foram incluídos neste estudo 44 indivíduos, sendo 16 pertencentes ao grupo Controle, 13 ao grupo SDRA e 15 ao grupo H1N1. As características demográficas dos três grupos estão apresentadas na tabela 4.

A média $\pm$ DP das idades dos pacientes dos grupos Controle, SDRA e H1N1 foi de 54 ± 15 , 43 ± 15 e 50 ± 12 anos, respectivamente ($p=0,133$). A principal causa de óbito para SDRA foi a sepse refratária (53%), e as principais causas de morte no grupo Controle foram as doenças cardiovasculares (56%).

Tabela 4. Dados demográficos e principais causas de óbito entre os grupos estudados.

Variável	Controle (n=16)	SDRA (n=13)	H1N1 (n=15)
Idade (anos)	54 $\pm$ 15	43 $\pm$ 15	50 $\pm$ 12
Gênero (Masculino/Feminino)	9/7	5/8	9/6
Principal causa de óbito, n (%)			
Insuficiência respiratória	-	4 (30)	11(73)
Doença cardiovascular	9 (56)	-	2 (13)
Doença hepática	4 (25)	-	-
Sepse refratária	-	6 (46)	2 (13)
Doença gastrointestinal	2 (12)	-	-
Sangramento gastrointestinal	1 (6)	3 (23)	-

Os pacientes do grupo SDRA apresentaram um quadro histológico clássico de dano alveolar difuso caracterizado por membranas hialinas, edema intra-alveolar e exsudato neutrofílico. Foi observado um padrão histológico exsudativo em todos os pacientes deste grupo, sendo que 4 destes também apresentaram um padrão histológico proliferativo inicial. Não foi observada extensa proliferação de tecido ou fibrose. Todos os pacientes foram ventilados utilizando a estratégia ventilatória protetora com baixo volume corrente (≤ 6 mL / kg), os parâmetros ventilatórios e a relação $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ estão apresentados na tabela 5. Neste grupo 3 pacientes apresentaram broncopneumonia secundária de acordo com o relatório da autópsia.

Tabela 5. Dias de evolução, parâmetros ventilatórios, relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e fatores predisponentes dos pacientes com Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

Pacientes	Dias de SDRA	Driving Pressure cmH_2O	PEEP cmH_2O	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	Fatores predisponentes
1	1	10	8	161	Hepatite fulminante
2	1	6	6	170,7	Cirrose
3	1	12	9	93,7	Lupus eritematoso sistêmico com choque hemorrágico
4	2	25	10	166,3	Pancreatite crônica com colangite
5	2	15	8	130,8	Cirrose; doença diarreica aguda
6	2	13	14	156,5	Linfoma disseminado

continua

continuação

7	2	10	11	111,7	Mielite
8	3	20	18	84	Cirrose
9	4	14	11	197	Mieloma múltiplo com sangramento gastrointestinal
10	6	15	10	196,7	Isquemia mesentérica aguda
11	9	12	17	119,7	Endocardite infecciosa
12	10	16	14	108,3	Cirrose com sangramento de varizes.
13	16	10	10	186,7	Abscesso inguinal com peritonite

Média±DP 4.5 ± 4.5 13 ± 4.7 11 ± 6.2 144 ± 39

PaO₂=pressão arterial de oxigênio(mmHg); FiO₂=fração inspirada de oxigênio; PEEP=pressão expiratória positiva final. Os valores de PaO₂/FiO₂ correspondem aos valores do diagnóstico clínico de SDRA. Para cada paciente, os valores de PEEP correspondem aos valores médios dos primeiros dois dias a partir do diagnóstico. Dias de SDRA correspondem ao período entre diagnóstico e óbito.

No grupo H1N1 todos os pacientes apresentaram extenso dano alveolar difuso exsudativo, com graus variáveis de hemorragia pulmonar e bronquiolite necrosante. Foi observada evidência de infecção bacteriana, nos pulmões de 6 pacientes, confirmada pela presença de coloração histoquímica positiva para as bactérias e/ou cultura positiva na aspiração brônquica e/ou PCR positivo.

Os paciente sem evidências de alterações histológicas pulmonares foram incluídos no grupo Controle. As imagens histológicas dos grupos Controle, SDRA e H1N1 estão apresentadas nas figuras 4 e 5.

Figura 4. Fotomicrografias do parênquima pulmonar, nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1(C). Observe em B e C a presença de membrana hialina, e septos alveolares com inflamação e edema presentes. A barra de escala corresponde a 100µm. Coloração hematoxilina e eosina.

Figura 5. Fotomicrografias das pequenas vias aéreas nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1(C). Observe em B e C as pequenas vias aéreas com sinais de edema, epitélio descamado e a presença de células inflamatórias. A barra de escala corresponde a 100µm. Coloração hematoxilina e eosina.

4.2 Análise morfométrica

Para análise foram selecionados ao todo 73 fragmentos de tecido pulmonar (1–3 fragmentos por paciente) contendo área de parênquima pulmonar e pequenas vias aéreas. Uma média de $26,4 \pm 8,1$ mm de septo alveolar foi analisada em cada coloração para cada paciente. Não houve diferença entre o comprimento total dos septos analisados nos grupos H1N1, SRDA e Controle ($25,7 \pm 7,4$ mm, $28,3 \pm 5,2$ mm, $25,3 \pm 10,6$ mm, respectivamente, $p=0,583$).

Um total de 1161 pequenas vias aéreas foram analisadas considerando todas as colorações utilizadas. O perímetro médio analisado nas pequenas vias aéreas nos grupos H1N1, SDRA e Controle foi de $2,4 \pm 0,6$ mm, $2,3 \pm 0,7$ mm, $2,1 \pm 0,9$ mm, respectivamente, ($p=0,70$). Devido a extensa área de bronquiólite necrosante em pacientes com H1N1, e uso extensivo de tecido para as análises, nem todos os casos tiveram as pequenas vias aéreas analisadas (Controle $n=7$, SDRA $n=10$, H1N1 $n=7$).

4.2.1 Análise morfométrica no parênquima pulmonar

A análise morfológica das densidades celulares nos três grupos apresentaram uma expressão significativamente maior de linfócitos T CD8 +, linfócitos T CD4+ e células dendríticas CD83 + no grupo H1N1 em comparação com os grupos SDRA e Controle ($p>0,05$). Observou-se também uma maior densidade celular de granzima A+ no grupo H1N1 quando comparado com o grupo Controle ($p>0,05$); e uma maior densidade de células NK CD57+ no grupo H1N1 quando comparado com o grupo de SDRA ($p>0,05$). (tabela 6)

Tabela 6. Densidade celular no parênquima pulmonar em cada marcador nos grupos Controle, SDRA e H1N1.

Marcadores (cels+10 ³ /μm)	Controle	SDRA	H1N1
CD8	3,7 [1,7]	3,7 [1,9]	6,6 [3,4]*
CD4	1 [0,9]	0,4 [0,8]	1,4 [1,9]*
CD20	0,6 [0,6]	0,4 [0,7]	0,7 [0,5]
CD 57	3 [2,2]	2 [1,2]	3,5 [3,5]°
Granzima B	5,6 [5,6]	7,2 [4,3]	7,5 [6,3]
Granzima A	6,8 [7,6]	7,3 [6]	10,2 [10,2]†
Quimase	0,5 [0,8]	0,6 [0,6]	0,6 [1,8]
Triptase	3 [1,6]	2 [2]	2,9 [2]
CD83	0,5 [0,5]	0,8 [0,8]	1,5 [1,4]*
IL-17	15 [13,5]	15,2 [7,2]	18 [8,4]

Valores expressos em mediana [intervalo interquartil];

* p <0,05 grupo H1N1 comparado com grupo SDRA e grupo Controle;

° p < 0,05 grupo H1N1 comparado com grupo SDRA;

† p <0,05 grupo H1N1 comparado com grupo Controle.

4.2.1.1 Linfócito T CD8+ no parênquima pulmonar

Houve uma maior densidade celular de Linfócitos T CD8+ no parênquima pulmonar no grupo H1N1 quando comparado com o grupo SDRA e grupo Controle (tabela 6 e gráfico 1).

Gráfico 1. Densidade de células T CD8+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 6. Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para células T CD8+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100μm.

4.2.1.2 Linfócito T CD4+ no parênquima pulmonar

O grupo H1N1 apresentou uma maior densidade celular de Linfócitos T CD4+ no parênquima em relação ao grupo SDRA e Controle (tabela 5 e gráfico 2).

Gráfico 2. Densidade de células T CD4+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 7. Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para células T CD4+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100μm.

4.2.1.2 Células NK (CD57) no parênquima pulmonar

Verificou-se uma maior densidade de células NK (CD57+) no grupo H1N1 em relação ao grupo SDRA (tabela 5, gráfico 3).

Gráfico 3. Densidade de células NK CD57+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 8. Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para células NK CD57+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100μm.

4.2.1.3 Célula Dendrítica (CD83+) no parênquima pulmonar

Observou-se uma maior densidade células dendríticas CD83+ no parênquima pulmonar no grupo H1N1 em relação ao grupo Controle (tabela 5, gráfico 4).

Gráfico 4. Densidade de células dendríticas CD83+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 9. Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para células dendríticas CD83+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100μm.

4.2.1.4 Granzima A+ no parênquima pulmonar

Houve uma maior densidade celular de granzima A+ no parênquima pulmonar do grupo H1N1 quando comparado com o grupo Controle (tabela 5 e gráfico 5).

Gráfico 5. Densidade de granzimas A+ no parênquima pulmonar nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 10. Fotomicrografia dos septos alveolares nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para granzima A+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100μm.

4.2.1.5 Linfócitos B (CD20+), granzima B+, mastócitos e IL-17+ no parênquima pulmonar

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação a densidade celular de Linfócitos B CD20+, granzima B+, mastócitos (quimase+ e triptase+) e IL-17+ no parênquima pulmonar dos três grupos analisados (tabela 5).

4.2.1.6 Foxp3 e CD207 no parênquima pulmonar

Após análise individual das lâminas de cada grupo para os marcadores CD207 e Foxp3, não foram verificadas quantidades expressivas de células marcadas positivamente no parênquima pulmonar, não sendo quantificados estes marcadores.

4.2.2 Análise morfológica das pequenas vias aéreas

A análise morfológica das densidades celulares nas pequenas vias aéreas apresentou uma diminuição de células dendríticas CD83+ no grupo H1N1 quando comparado ao grupo Controle ($p>0,05$). O mesmo pode ser observado para as células dendríticas de Langerhans CD207+ com a diminuição dessas células no grupo H1N1 em relação aos grupos Controle e SDRA ($p>0,05$). Também houve uma diminuição da densidade de mastócitos (triptase+) no grupo H1N1 e SDRA quando comparados ao grupo Controle ($p>0,05$). Por outro lado a densidade celular de granzima A+ foi maior no grupo H1N1 em relação ao grupo SDRA e Controle, e maior densidade de IL-17+ no grupo H1N1 e SDRA em relação ao grupo Controle ($p>0,05$) (tabela 7).

Tabela 7. Densidade de células positivas nas pequenas vias aéreas em cada marcador nos grupos Controle, SDRA e H1N1.

Marcadores (cels+10 ³ /μm)	Controle	SDRA	H1N1
CD8	17,2 [16,6]	31,1[27,6]	37 [67,8]
CD4	17,6 [17,2]	13,3 [16,1]	22,7 [34,4]
CD20	8,1[16,5]	3,6 [9,6]	9,4 [10,2]
CD 57	5,6 [2,2]	2,9 [1,4]	3,4 [2,4]
Granzima B	33,2 [16,1]	30,9 [22,5]	39,5 [38,3]
Granzima A	8,6 [8,4]	7,6 [14,3]	32 [38,9] [°]
Quimase	8,8 [7,5]	6,8 [5,2]	5,8 [6,9]
Triptase	20,3 [13,3]	14,7 [9,7]	14,1 [7,5] [*]
CD207	2,9 [2,7]	0,9 [1,4]	0,4 [1,6] [*]
CD83	14,5 [10,1]	12,2 [7,1]	6,6 [5,4] [†]
IL-17	9,2 [3,7]	20,7 [16,4]	20,9 [22] [*]

Valores expressos em mediana [intervalo interquartil];

[°]p <0,05 grupo H1N1 comparado com grupo SDRA e grupo Controle;

^{*} p <0,05 grupo Controle comparado com grupo SDRA e H1N1;

[†] p <0,05 grupo Controle comparado com grupo H1N1.

4.2.2.1 Granzima A+ nas pequenas vias aéreas

Observou-se uma maior densidade celular de granzima A+ nas pequenas vias aéreas no grupo H1N1, quando comparado com o grupo SDRA e Controle (tabela 7 e gráfico 6).

Gráfico 6. Densidade de granzimas A+ nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 11. Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para granzimas A+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100μm.

4.2.2.2 Mastócito (triptase+) nas pequenas vias aéreas

O grupo H1N1 e SDRA apresentou uma menor densidade celular de mastócitos (triptase+) nas pequenas vias aéreas em relação ao grupo Controle (tabela 7 e gráfico 7).

Gráfico 7. Densidade de mastócitos (triptase+) nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 12. Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para mastócito (triptase+) (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100μm.

4.2.2.3 Célula dendrítica de Langerhans (CD207+) nas pequenas vias aéreas

A densidade de células dendríticas de Langerhans (CD 207+) nas pequenas vias aéreas foi maior no grupo Controle em relação ao grupo SDRA e H1N1 (Tabela 7 e gráfico 8).

Gráfico 8. Densidade de células dendríticas CD207+ nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 13. Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para células dendríticas CD207+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100μm.

4.2.2.4 Célula dendrítica (CD83+) nas pequenas vias aéreas

A densidade de células dendríticas CD83+ nas pequenas vias aéreas foi menor nos grupos SDRA e H1N1 em relação ao grupo Controle (tabela 7 e gráfico 9).

Gráfico 9. Densidade de células dendríticas CD83+ nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 14. Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para células dendríticas CD83+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100µm

4.2.2.5 IL-17+ nas pequenas vias aéreas

Os grupos H1N1 e SDRA apresentaram uma maior densidade de IL-17 nas pequenas vias aéreas em relação ao grupo Controle (tabela 7 e figura 10).

Gráfico 15. Densidade de IL17+ nas pequenas vias aéreas nos grupos Controle, SDRA e H1N1. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Figura 10. Fotomicrografia das pequenas vias aéreas nos grupos Controle (A), SDRA (B), H1N1 (C), com marcação imuno-histoquímica para IL-17+ (seta vermelha). A barra de escala corresponde a 100 μm.

4.2.2.6 Linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfócitos B CD20+, células NK (CD57+), mastócitos (quimase+), granzima B+. nas pequenas vias aéreas.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação a densidade celular dos linfócitos T CD4+ e T CD8+, linfócitos B CD20+, células NK (CD57+), mastócitos (quimase+) e granzima B+ (tabela 7).

4.2.2.7 Foxp3+ nas pequenas vias aéreas

Verificou-se que a ausência de quantidades expressivas de células Foxp3 marcadas positivamente na análise das pequenas vias aéreas, não sendo quantificado este marcador.

4.2.3 Correlações morfométricas

Uma correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e linfócitos T CD8+ ($R=0,929$; $p=0,003$) e T CD4+ ($R=0,886$; $p=0,019$) nas pequenas vias aéreas dos pacientes pertencentes ao grupo H1N1 (gráficos 11 e 12) foi encontrada.

Gráfico 11. Correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e linfócitos T CD8+ nas pequenas vias aéreas do grupo H1N1.

Gráfico 12. Correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e linfócitos T CD4+ nas pequenas vias aéreas do grupo H1N1.

Verificamos uma correlação positiva entre a IL-17+ e a granzima A+, tanto no parênquima pulmonar ($R=0,714$; $p=0,006$), como nas pequenas vias aéreas ($R=0,829$; $p=0,042$) (gráficos 13 e 14).

Gráfico 13. Correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e IL-17+ no parênquima pulmonar do grupo H1N1.

Gráfico 14. Correlação positiva entre a densidade celular de granzima A+ e IL-17+ nas pequenas vias aéreas do grupo H1N1.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, analisamos um amplo painel de células relacionadas com a imunidade inata e adaptativa nos pulmões de pacientes que faleceram pela infecção do influenza A (H1N1)pdm09. Citados pacientes desenvolveram a forma grave da doença evoluindo com DAD constatado à autópsia. A análise da densidade celular nestes pacientes demonstrou que eles apresentaram um fenótipo inflamatório no parênquima pulmonar com aumento das células T CD4+, T CD8+, células dendríticas (CD83+), células NK (CD57+) e granzima A+, diferente do fenótipo encontrado nas pequenas vias aéreas com uma diminuição de mastócitos (triptase) e células dendríticas (CD83+, CD207+), e com aumento da granzima A e IL-17.

Parte dos paciente infectados pelo vírus influenza A(H1N1)pdm09, evoluem com a SDRA (19) (24). Com o intuito de estabelecer quais os aspectos específicos da lesão pulmonar por A(H1N1)pdm09, foram utilizados 2 grupos como controle para a nossa análise, um grupo com SDRA não viral de causa extrapulmonar, e um grupo controle, com indivíduos que faleceram de causas não-pulmonares. Achados relevantes no grupo SDRA foram identificados, com uma diminuição de mastócitos (triptase) e células dendríticas (CD83+, CD207+), e com aumento de IL-17 nas VAS. Interessante ressaltar que não foram constatadas alterações das células imunes no parênquima pulmonar dos paciente do grupo SDRA quando comparado com grupo Controle. Isso pode ser parcialmente explicado pelo fato de que os pacientes deste grupo tinham etiologia extrapulmonar, e portanto possivelmente apresentaram a resposta imunológica primária fora dos pulmões.

Atualmente está bem estabelecido e descrito o papel dos neutrófilos como componente principal na inflamação em casos com SDRA, entretanto é importante ressaltar que os neutrófilos interagem com outras células do sistema imune, como as células T (47). Além disso os neutrófilos tem um tempo de vida curto, sugerindo que outras células do sistema imune estejam envolvidas na manutenção desta resposta inflamatória. O dano alveolar difuso apresenta diferentes etiologias, sendo plausível a hipótese de diferentes respostas inflamatórias dependendo de cada etiologia, porém este é um tema pouco abordado na literatura.

Com relação ao curso clínico da SDRA por H1N1, este apresenta-se diferente da SDRA não viral, com uma recuperação da troca gasosa mais prolongada, maior necessidade de apoio de oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO), além de apresentar um maior tempo de internação na UTI (48). Nossa casuística é composta de tecidos pulmonares de paciente que foram a óbito com SDRA causada pela infecção da influenza A (H1N1)pdm09, e por pacientes que foram a óbito com a SDRA de causa extrapulmonar. Atualmente poucos estudos trazem a abordagem da resposta imune em humanos e grande parte dos relatos que envolvem a resposta imunológica, são realizados em modelos experimentais.

O sistema imune inato é composto por macrófagos, neutrófilos, células NK e células dendríticas, que desempenham um papel crucial na iniciação e condução subsequente da resposta imune adaptativa. Além disso, promovem e localizam a inflamação e produção de citocinas, que recrutam leucócitos adicionais para o local da infecção. No entanto, a estimulação excessiva ou

descontrolada da resposta imune inata pode ser prejudicial (49). Kash et al, em uma análise com camundongos infectados com o vírus da influenza reconstruído de 1918, verificaram uma ativação aumentada e acelerada de genes da resposta imune do hospedeiro, associados a uma apresentação patológica pulmonar grave (50). Mauad et al. demonstraram haver maior expressão de TLR-3 e IFN- γ nos pulmões mostrando haver resposta inata exacerbada nestes pacientes (23).

Em nossos achados observamos uma maior densidade de linfócitos T CD4+ e T CD8+ no parênquima pulmonar de pacientes com vírus influenza A(H1N1)pdm09, em relação ao grupo Controle e grupo SDRA não viral. Os linfócitos T CD4+ e T CD8+ estão envolvidos na resposta imune adaptativa e estudos mostram que suas ações estão relacionadas com a eliminação do vírus, mas podem levar a lesão pulmonar. Esta lesão pode ocorrer por ação direta nas células epiteliais pulmonares infectadas contribuindo para formação de exsudatos das vias aéreas ou através da expressão/quimiotaxia de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (por exemplo, IFN- γ , TNF- α , IL-17 e MIP-1 α) (51).

Como esperado a resposta imune no grupo H1N1, apresentou características da resposta citotóxica, com aumento dos linfócitos TCD8+, células NK+ no parênquima pulmonar e granzima A+ no parênquima e nas pequenas vias aéreas. As granzimas são de uma família de cinco serino-proteases presentes nos grânulos das células citotóxicas, precisando da perforina para exercer sua atividade citotóxica, com indução à apoptose por diferentes formas. A granzima A está presente em maior abundância, mas a granzima B tem uma ação citotóxica mais potente (52). Em nossa análise

quantitativa observamos a presença aumentada da granzima A+ tanto no parênquima pulmonar como nas pequenas vias aéreas, com uma correlação positiva com CD4+ e CD8+ nas vias aéreas. Harari et al. descreveram a presença de células T CD8+ no sangue de pacientes com o vírus da influenza, e observaram que a granzima A não estava associada a um papel citotóxico (53). Hirota et al observaram aumento de granzimas B no tecido pulmonar (biópsia e autópsia) de pacientes com SDRA, mas as causas da SDRA não foram descritas em seu estudo (54). Não está claro se o perfil de granzimas em casos com A(H1N1)pdm09 e nas vias aéreas de casos com SDRA estão associados a uma capacidade citotóxica reduzida e, portanto aumento da gravidade da doença. Em nosso estudo não observamos maior densidade celular de granzima B no parênquima pulmonar e nas pequenas vias aéreas dos grupos analisados, e possivelmente isto possa ter acontecido, pois nossa análise foi realizada em uma fase posterior ao diagnóstico, podendo ser plausível a hipótese de que as granzimas B, pela sua ação citotóxica, esteja presente somente nos momentos iniciais da doenças.

Em nossos achados observamos uma densidade maior de células NK no grupo H1N1 em comparação ao grupo SDRA não viral. Carrem et al. sugerem que as células NK podem ser uma fonte de mediadores imunes (IFN- γ , CCL3, CCL4, e CCL5) e, como tal poderiam facilitar diretamente o recrutamento de várias células inflamatórias para o sítio da inflamação, levando a um aumento na lesão pulmonar em pacientes com o vírus (55).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno e estão relacionadas a ativação e regulação da resposta imune adaptativa. Tem papel importante de conexão entre a resposta imune inata e adaptativa, pois

respondem rapidamente a presença de infecções, podendo ativar os linfócitos, particularmente os linfócitos T CD4+ e no caso de infecções virais os linfócitos T CD8+. Em nosso estudo a resposta das células dendríticas maduras (CD83+) apresentou-se com um aumento da densidade celular no parênquima pulmonar no grupo H1N1 e diminuição da sua densidade nas pequenas vias aéreas nos grupos H1N1 e SDRA. O mesmo pode ser observado nas pequenas vias aéreas com as células dendríticas de Langerhans (CD207+) com a diminuição nos grupos H1N1 e SDRA, em relação ao grupo Controle. Este padrão de resposta das células dendríticas, também foi descrito em um modelo experimental com ratos, no qual foi observada a depleção de células dendríticas mielóides CD11b+ e CD11b2 nas vias aéreas até o 4º dia de infecção, retornando ao basal somente no 4º dia após a infecção. No parênquima pulmonar elas estavam elevadas até o 14º dia, mantendo-se assim até o 21º dia após a infecção (56). Khatri et al (2010) em um modelo experimental de inflamação pulmonar aguda em suínos gerada por infecção viral, também verificaram um aumento na densidade de células dendríticas no parênquima pulmonar. Além disso, também foi constatado neste estudo o aumento de linfócitos T CD4+ e CD8+, bem como um aumento de IL-12 produzido pelas células dendríticas ativando células NK e estimulando a produção de IFN- γ (57). As células dendríticas nas vias aéreas tendem a ser as primeiras a ter contato com o antígeno, e por essa razão tem sido especulado que esta redução inicial está relacionada ao aumento da migração dessas células para os linfonodos ou por apoptose. No parênquima pulmonar as células dendríticas representariam um microambiente importante nas fases

tardias da infecção, regulando a resposta das células T (58). Um estudo *in vitro* demonstrou que a infecção pelo vírus do H1N1, em comparação com outros vírus da influenza sazonal, está associada a uma maturação prejudicada das células dendríticas (59). Este é o primeiro estudo que demonstra a densidade de células dendríticas em grupos com SDRA em decorrências de causas virais e não virais em tecido humano, mostrando uma divergência na resposta no parênquima pulmonar e nas pequenas vias aéreas nos casos virais.

Células T regulatórias ajudam a manter a homeostase imune, além de modularem as respostas imunes durante a infecção (42). Nossa hipótese inicial, era que essas células estivessem expressas em menor número em pacientes com a forma mais grave da infecção por H1N1, o que explicaria a resposta imune extensa presente nestes casos. Betts et al. verificaram em seu estudo uma robusta resposta das células T regulatórias pós infecção por influenza A (H1N1)pdm09 apenas nos estágios iniciais da doença em um modelo experimental com camundongos (60). Em nossa análise não verificamos densidades expressivas de foxp3 no parênquima pulmonar nos três grupos analisados. Este achado pode-se dar pelo estágio da doença, em que nossos casos foram analisados

A IL-17 é uma citocina da imunidade adaptativa, tendo como efeito biológico principal a ação pró-inflamatória (61). Esta citocina é também conhecida por estar envolvida na patogênese de casos com dano alveolar difuso, e principalmente devido à sua capacidade em regular o influxo de neutrófilos. Níveis elevados de IL-17 podem representar um indicador de gravidade da doença em casos de infecção severa pelo vírus influenza A(H1N1)pdm09 (62) (63) (44). Em nossos resultados não observamos

diferenças nas densidades celulares no parênquima pulmonar dos 3 grupos analisados. Surpreendentemente, nas pequenas vias aéreas dos grupos com dano alveolar difuso analisados foram observados níveis elevados de IL-17. Este resultado reforça a contribuição das vias aéreas na patogênese de doenças intersticiais agudas pela secreção de citocinas, granzima A e mediadores inflamatórios envolvidos nas fases iniciais da lesão pulmonar aguda (64) (65).

Os mastócitos são células presentes em tecidos que realizam interface com o ambiente externo tais como a pele, trato gastrointestinal e urinário e tecido pulmonar. Apresentam papel importante na defesa contra alguns patógenos tais como bactérias, parasitas e vírus. A atuação dos mastócitos em algumas doenças alérgicas e infecções bacterianas tem sido amplamente estudado e discutido, entretanto, o seu papel nas infecções virais principalmente nas decorrentes de infecção por vírus influenza A, e em casos com SDRA tem sido pouco explorado até o momento. Encontramos uma diminuição da densidade de mastócitos (triptase+) nas pequenas vias aéreas nos grupos com DAD. Segundo Graham et al. o vírus H1N1, pode infectar os mastócitos e estimular a liberação de citocinas e quimiocinas (66) . Por outro lado, Liu et al demonstraram que o vírus influenza A H1N1 pode induzir a apoptose de mastócitos pela via intrínseca (ativação da via mitocôndria/citocromo-C) em modelo de cultura de células, o que poderia explicar nossos achados (67). Nos casos de DAD não viral, a razões para a diminuição da densidade celular na vias aéreas não está clara. Interessante citar que não foram observadas diferenças nas densidade de mastócitos nas regiões do parênquima pulmonar em nenhum dos grupos. Esses resultados podem ser

explicados pelo fato dos casos com DAD não viral estarem em sua maioria na fase exsudativa ou proliferativa inicial. Liebler et al analisaram casos com SDRA em diferentes estágios histológicos, e encontraram um aumento de mastócitos somente em casos na fase fibroproliferativa tardia, sugerindo que estas células não estão envolvidas na fibrinogenese (68).

Os linfócitos B quando ativados, se diferenciam em plasmócitos tendo como principal função a produção de anticorpos. Podem se diferenciar ainda em células de memória. Em alguns casos, os linfócitos B necessitam dos linfócitos T para se ativar sendo que, em alguns casos, os linfócitos T controlam ainda qual anticorpo deve ser produzido (69). Em nosso estudo, não encontramos diferença na densidade de linfócitos B entre os grupos estudados.

Algumas limitações do presente estudo devem ser abordadas. Devido ao caráter retrospectivo do estudo tivemos acesso limitado a dados clínicos no momento da morte, especialmente nos casos de pacientes com A(H1N1)pdm09, pois alguns apresentaram a forma grave da doença, ocorrendo o óbito em poucos dias e em outras instituições (23) . Além disso, analisou-se o tecido pulmonar de doentes que desenvolveram a doença grave, os quais podem se apresentar de maneira diferente em casos menos graves de DAD, e isso poderia explicar a falta de correlações significativas clínicas-morfológicas. A quantificação celular foi apenas realizada em campos onde o septo era mensurável. Desta forma, as áreas com intensa atelectasia ou necrose não foram analisadas e nossos resultados podem estar subestimados. Em ambos os grupos com DAD tivemos casos com infecção bacteriana secundária, o que pode ter influenciado os resultados. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas quando os casos com broncopneumonia

em ambos os grupos H1N1 e SDRA foram comparados com os casos sem broncopneumonia ($p > 0,05$). Além disso fomos capazes de identificar um perfil citotóxico compatível com a infecção viral nos casos de influenza A(H1N1)pdm.

6. CONCLUSÃO

1. O perfil das células imunes em pacientes que foram a óbito pela infecção do vírus influenza A (H1N1)pdm09 com DAD apresentou um padrão celular citotóxico bem definido no parênquima pulmonar, com aumento do número de linfócitos T CD4+ e T CD8+, células NK+ e granzima+ A associado a um aumento de células dendríticas maduras CD83+.

2. Na análise das pequenas vias aéreas o grupo de pacientes que foi a óbito com DAD causado pela influenza A(H1N1)pdm09 apresentou uma diminuição da densidade de células dendríticas e mastócitos, e um aumento de IL-17 em relação ao grupo Controle, associado a um aumento da densidade celular de granzima A+ em relação aos grupos Controle e SDRA

3. O DAD causado pela infecção do vírus A(H1N1)pdm09 apresenta-se associado com um fenótipo inflamatório diferente dos casos com DAD de causa não viral, com uma resposta inflamatória parcialmente diferente no parênquima pulmonar em relação as pequenas vias aéreas.

4. Uma correlação positiva entre a IL-17 e a granzima A+ no parênquima pulmonar e nas pequenas vias aéreas, foi observada nos pacientes com influenza A(H1N1)pdm09. Além disso, neste mesmo grupo de pacientes, houve uma correlação positiva entre a densidade celular da granzima A+ e os linfócitos T CD8+ e T CD4+ nas pequenas vias aéreas.

7. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. A manual for estimating disease burden associated with seasonal influenza. *Global Influenza Programme of the World Health Organization*. Geneva-disponível em: http://www.who.int/influenza/resources/publications/manual_burden_of_disease/en/; 2015.
2. Taubenberger JK, Morens DM. Pandemic influenza--including a risk assessment of H5N1. *Rev Sci Tech* 2009;28:187-202.
3. Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* 2002;76:105-115.
4. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006;12:15-22.
5. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The Persistent Legacy of the 1918 Influenza Virus. *N Engl J Med* 2009;361:225-229.
6. Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med* 2009;361:279-285.
7. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation. *Cell host & microbe* 2010;7:440-451.

8. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009;459:931-939.
9. Carneiro M, Trench FJP, Waib LF, Pedro FL, Motta F. H1N1 Influenza 2009: review of the first pandemic of the XXI century. *AMIRGS* 2010;54:206-213.
10. He D, Lui R, Wang L, Tse CK, Yang L, Stone L. Global Spatio-temporal Patterns of Influenza in the Post-pandemic Era. *Sci Rep* 2015;5:11013.
11. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, Bandaranayake D, Breiman RF, Brooks WA, Buchy P, Feikin DR, Fowler KB, Gordon A, Hien NT, Horby P, Huang QS, Katz MA, Krishnan A, Lal R, Montgomery JM, Molbak K, Pebody R, Presanis AM, Razuri H, Steens A, Tinoco YO, Wallinga J, Yu H, Vong S, Bresee J, Widdowson MA. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 2012;12:687-695.
12. Ministério da Saude. Situação epidemiológica da Influenza Pandêmica (H1N1) 2009 no Mundo e no Brasil, até a Semana Epidemiológica 47 de 2009. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-influenza>; [accessed April 23 ,2016].
13. Centro de vigilância epidemiológica - CVE/SES - SP. Informe Técnico - Influenza Pandêmica H1N1 2009 Fase pós-pandêmica - Atualização.

disponível em: http://www.cvesaude.sp.gov.br/htm/resp/pdf/IF11_INFLUENZA_2701pdf; [citado 22 maio 2016].

14. World Health Organization. H1N1 in post-pandemic period. disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/; [citado 22 maio 2016].

15. World Health Organization. Influenza Update N° 259. disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en/; [citado 01 maio 2016].

16. World Health Organization. Risk Assessment - Seasonal Influenza A(H1N1)pdm09. disponível em: http://www.who.int/influenza/publications/riskassessment_AH1N1pdm09_201602/en/; [citado 01 maio 2016].

17. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico - Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 17 de 2016. disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/09/informe-epid-influenza-se17-2016pdf>; [citado 22 maio 2016].

18. Domínguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A, Poblano-Morales M, Baltazar-Torres JA, Bautista E, Martinez A, Martinez MA RE, Valdez R, Ruiz-Palacios G, Hernández M, Stewart TE, Fowler RA. Critically Ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA* 2009;302:1880-1887.

19. Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, Cook DJ, Marshall J, Lacroix J, Stelfox T, Bagshaw S, Choong K, Lamontagne F, Turgeon AF, Lapinsky S, Ahern SP, Smith O, Siddiqui F, Jouvett P, Khwaja K, McIntyre L, Menon K, Hutchison J, Hornstein D, Joffe A, Lauzier F, Singh J, Karachi T, Wiebe K, Olafson K, Ramsey C, Sharma S, Dodek P, Meade M, Hall R, Fowler RA, 'Canadian Critical Care Trials Group H1N1 Collaborative'. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA* 2009;302:1872-1879.
20. Hui DS, Lee N, Chan PK. Clinical management of pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection. *Chest* 2010;137:916-925.
21. World Health Organization. Recommended use of antivirals. Pandemic (H1N1) 2009 briefing note 8. disponível em: http://www.hoint/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_use_antivirals_20090820/en/; [citado 01 maio 2016].
22. Shieh WJ, Blau DM, Denison AM, Deleon-Carnes M, Adem P BJ, Sumner J, Liu L, Patel M, Batten B, Greer P, Jones T, Smith C, Bartlett J, Montague J, White E, Rollin D, Gao R, Seales C, Jost H, Metcalfe M, Goldsmith CS, Humphrey C, Schmitz A, Drew C, Paddock C, Uyeki TM, Zaki SR. 2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States. *Am J Pathol* 2010;177:166-175.

23. Mauad T, Hajjar LA, Callegari GD, da Silva LF, Schout D, Galas FR, Alves VA, Malheiros DM, Auler JO Jr, Ferreira AF, Borsato MR, Bezerra SM, Gutierrez PS, Caldini ET, Pasqualucci CA, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:72-913.
24. ANZIC-Influenza-Investigators, Webb SA, Pettilä V, Seppelt I, Bellomo R, Bailey M, Cooper DJ, Cretikos M, Davies AR, Finfer S, Harrigan PW, Hart GK, Howe B, Iredell JR, McArthur C, Mitchell I, Morrison S, Nichol AD, Paterson DL, Peake S, Richards B, Stephens D, Turner A, Yung M. Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. *N Engl J Med* 2009;361:1925-1934.
25. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-323.
26. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307:2526-2533.
27. Katzenstein AL, Colin M, Leibow AA. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol* 1976;85:209-228.
28. Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care*6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax* 2002;57:540-546.

29. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodriguez JM, Aramburu JA, Peñuelas O, Cortés-Puch I, Cardinal-Fernández P, Lorente JA, Frutos-Vivar F. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:761-767.
30. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-1349.
31. Katzenstein A-L A. *Katzenstein and Askin's surgical pathology of non-neoplastic lung disease. Major problems in pathology*. Philadelphia: Edinburgh; 2006.
32. Castro CY. ARDS and diffuse alveolar damage: a pathologist's perspective. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2006;18:13-19
33. Parambil JG, Myers JL, Aubry MC, Ryu JH. Causes and prognosis of diffuse alveolar damage diagnosed on surgical lung biopsy. *Chest* 2007;132:50-57.
34. Rosen DG, Lopez AE, Anzalone ML, Wolf DA, Derrick SM, Florez LF, Gonsoulin ML, Hines MO 3rd, Mitchell RA, Phatak DR, Haden-Pinneri K, Sanchez LA. Postmortem findings in eight cases of influenza A/H1N1. *Mod Pathol* 2010;23:1449-1457.

35. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 2014;14:315-328.
36. Lee KY, Rhim JW, Kang JH. Hyperactive immune cells (T cells) may be responsible for acute lung injury in influenza virus infections: a need for early immune-modulators for severe cases. *Med Hypotheses* 2011;76:64-69.
37. Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res* 2011;162:19-30.
38. MacPherson G, Austyn J. *Exploring Immunology: Concepts and Evidence* - Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2012.
39. McGill J, Heusel JW, Legge KL. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J Leukoc Biol* 2009;86:803-812.
40. St John AL, Abraham SN. Innate immunity and its regulation by mast cells. *J Immunol* 2013;190:4458-4463.
41. La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, Doherty PC. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:85-92.
42. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypic and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* 2011;11:119-130.

43. Wensink AC, Hack CE, Bovenschen N. Granzymes regulate proinflammatory cytokine responses. *J Immunol* 2015;194:491-497.
44. Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramírez P, Martin-Loeches I, Varillas D, Gallegos MC, Serón C, Micheloud D, Gomez JM, Tenorio-Abreu A, Ramos MJ, Molina ML, Huidobro S, Sanchez E, Gordón M, Fernández V, Del Castillo A, Marcos MA, Villanueva B, López CJ, Rodríguez-Domínguez M, Galan JC CR, Lietor A, Rojo S, Eiros JM, Hinojosa C, Gonzalez I, Torner N, Banner D, Leon A, Cuesta P, Rowe T, Kelvin DJ. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care* 2009;13:R201.
45. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* 2008;32:61-69.
46. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* 2008;32:61-69.

47. Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol* 2009;30:522-530.
48. Töpfer L, Menk M, Weber-Carstens S, Spies C, Wernecke KD, Uhrig A, Lojewski C, Jörres A, Deja M. Influenza A (H1N1) vs non-H1N1 ARDS: analysis of clinical course. *J Crit Care* 2014;29:340-346.
49. Wu W, Booth JL, Duggan ES, Wu S, Patel KB, Coggeshall KM, Metcalf JP. Innate immune response to H3N2 and H1N1 influenza virus infection in a human lung organ culture model. *Virology* 2010;396:178-188.
50. Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, Carter V, Perwitasari O, Thomas MJ, Basler CF, Palese P, Taubenberger JK, García-Sastre A, Swayne DE, Katze MG. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature* 2006;443:578-581.
51. Kim TS, Sun J, Braciale TJ. T cell responses during influenza infection: getting and keeping control. *Trends Immunol* 2011;May;32(5):225-31.
52. Moffat JM, Gebhardt T, Doherty PC, Turner SJ, Minter JD. Granzyme A expression reveals distinct cytolytic CTL subsets following influenza A virus infection. *Eur J Immunol* 2009;39:1203-1210.

53. Harari A, Bellutti Enders F, Cellerai C, Bart PA, Pantaleo G. Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure. *J Virol* 2009 83:2862-2871.
54. Hirota JA, Hiebert PR, Gold M, Wu D, Graydon C, Smith JA AK, McNagny K, Granville DJ, Knight DA. Granzyme B deficiency exacerbates lung inflammation in mice after acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:453-462.
55. Abdul-Careem MF, Mian MF, Yue G, Gillgrass A, Chenoweth MJ, Barra NG, Chew MV, Chan T, Al-Garawi AA, Jordana M, Ashkar AA. Critical role of natural killer cells in lung immunopathology during influenza infection in mice. *J Infect Dis* 2012;206:167-177.
56. Strickland DH, Fear V, Shenton S, Wikstrom ME, Zosky G, Larcombe AN, Holt PG, Berry C, von Garnier C, Stumbles PA. Persistent and compartmentalised disruption of dendritic cell subpopulations in the lung following influenza A virus infection. *PLoS One* 2014;9:e111520.
57. Khatri M, Dwivedi V, Krakowka S, Manickam C, Ali A, Wang L, Qin Z, Renukaradhya GJ, Lee CW. Swine influenza H1N1 virus induces acute inflammatory immune responses in pig lungs: a potential animal model for human H1N1 influenza virus. *Journal of virology* 2010;84:11210-11218.

58. Unkel B, Hoegner K, Clausen BE, Lewe-Schlosser P, Bodner J, Gattenloehner S, Janßen H, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S. Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia. *J Clin Invest* 2012;122:3652-3664.
59. Chin R, Earnest-Silviera L, Gordon CL, Olsen K, Barr I, Brown LE, Jackson DC, Torresi J. Impaired dendritic cell maturation in response to pandemic H1N109 influenza virus. *J Clin Virol* 2013;56:226-231.
60. Betts RJ, Prabhu N, Ho AW, Lew FC, Hutchinson PE, Rotzschke O, Macary PA, Kemeny DM. Influenza A virus infection results in a robust, antigen-responsive, and widely disseminated Foxp3+ regulatory T cell response. *J Virol* 2012;86:2817-2825.
61. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007;19:362-371.
62. Muir R, Osbourn M, Dubois AV, Doran E, Small DM, Monahan A, O'Kane CM, McAllister K, Fitzgerald DC, Kissenpfennig A, McAuley DF, Ingram RJ. Innate Lymphoid Cells Are the Predominant Source of IL-17A during the Early Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;93:407-416.

63. Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, Ross TM, Witztum JL, Kolls JK. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J Immunol* 2009;183:5301-5310.
64. Morales MM, Pires-Neto RC, Inforsato N, Lanças T, da Silva LF, Saldiva PH, Mauad T, Amato MB, Dolhnikoff M. Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue. *Crit Care* 2011;15:R4.
65. Pires-Neto RC, Morales MM, Lancas T, Inforsato N, Duarte MI, Amato MB, de Carvalho CR, da Silva LF, Mauad T, Dolhnikoff M. Expression of acute-phase cytokines, surfactant proteins, and epithelial apoptosis in small airways of human acute respiratory distress syndrome *J Crit Care* 2013;28:111.e9-111.e15.
66. Graham AC, Hilmer KM, Zickovich JM, Obar JJ. Inflammatory response of mast cells during influenza A virus infection is mediated by active infection and RIG-I signaling. *J Immunol* 2013;190:4676-4684.
67. Liu B, Meng D, Wei T, Zhang S, Hu Y, Wang M. Apoptosis and pro-inflammatory cytokine response of mast cells induced by influenza A viruses. *PLoS One* 2014;9:e100109.
68. Liebler JM, Qu Z BB, Powers MR, Rosenbaum JT. Fibroproliferation and mast cells in the acute respiratory distress syndrome. *Thorax* 1998;53:823-829.

69. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S33-40.

Apêndice

1. Documento de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP) para realização desta pesquisa.

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **12/12/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **411/12** intitulado: **"IMUNOPATOLOGIA DA LESÃO PULMONAR CAUSADA PELA INFECÇÃO DO H1N1"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Thais Mauad**

Pesquisador (a) Executante: **Monique Buttignol**

Encaminhe-se à CFM-FMUSP
para as devidas providências.
SP. 14.10.2012 B

CEP-FMUSP, 14 de Dezembro de 2012.

Prof. Dra. Márcia Dalastra Laurenti
Programa de Fisiopatologia Experimental
Pós-Graduação em Ciências
Suplente de Coordenadora

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

Apêndice

2. Artigo submetido a revista *American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine* como conclusão desta dissertação de mestrado.

Airway and parenchyma immune cells in influenza A H1N1 viral and non-viral diffuse alveolar damage

Monique Buttignol¹, Ruy Camargo Pires-Neto¹, Renata Calciolari Rossi e Silva¹,
Marina Ballarin Albino¹, Marisa Dolhnikoff¹, Thais Mauad¹

¹Departament of Pathology, University of São Paulo – School of Medicine, São Paulo, Brazil

Corresponding Author: Monique Buttignol, Department of Pathology, University of São Paulo – School of Medicine (FMUSP), São Paulo, Brazil; Av. Dr. Arnaldo, 455 – 1 andar, sala 1155; São Paulo - SP, Brasil, Postal Code: 01246903; Phone: +551130618521; E-mail address: monique.buttignol@usp.br

Substantial contributions to the concept and design: MB, MD, TM; Laboratory analysis and interpretation: MB, RCPN, RCRS, MB, TM; Manuscript preparation and significant intellectual input: MB, PR, RR, MBA, MD, TM; Final approval: MB, RCPN, RCRS, MBA, MD, TM; Accountability: MB, RCPN, RCRS, MBA, MD, TM.

Running head: Immune cells in diffuse alveolar damage.

Descriptor number: 4.1 ALI/ARDS: Biological Mechanisms.

What is the current scientific knowledge on this subject?

Diffuse alveolar damage is considered the pathological hallmark of acute respiratory distress syndrome (ARDS), and it can occur as a result of different forms of lung insult. It has been suggested that the immunopathologic response can vary in the different causes of diffuse alveolar damage, but to date, there have been no studies comparing the immunopathology in different groups.

What does this study add to the field?

We have demonstrated that the immune cellular profiles of diffuse alveolar damage from viral A(H1N1)pdm09 and non-viral DAD are different, with higher expression of T lymphocytes and dendritic and granzyme A+ cells in the alveolar parenchyma of patients who died from influenza A(H1N1)pdm09 DAD, with a divergent pattern of dendritic and mast cell depletion on the small airway level. Significant immune alterations were present only in the small airways in non-viral DAD cases, reinforcing the role of small airways in the pathogenesis of exudative ARDS.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's Table of Contents online at www.atsjournals.org.

This work was funded by the Brazilian Research Council (CNPq).

ABSTRACT

Rationale: Diffuse alveolar damage (DAD), which is the histological surrogate for acute respiratory distress syndrome (ARDS), has a multifactorial etiology. It is possible that the immunopathology differs among the various presentations of DAD. **Objectives:** To compare lung immunopathology of viral (influenza A(H1N1)pdm09) to non-viral, extrapulmonary etiologies in autopsy cases with DAD. **Methods:** Lung tissue of 44 patients, was divided in the H1N1 group (n=15) characterized by severe pulmonary injury due to influenza A(H1N1)pdm09 infection; the ARDS group (n=13), characterized by patients with DAD due to non-pulmonary causes; and the Control group (n=16), consisting of patients with non-pulmonary causes of death. **Measurements and results:** Immunohistochemistry and image analysis were used to quantify, in the parenchyma and small airways, several immune cell markers. There was higher expression of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, CD83+ dendritic cells, granzyme A+ and natural killer+ cell density in the lung parenchyma of the H1N1 group ($p<0.05$). In the small airways, there was a lower cell density of tryptase+ mast cells and dendritic+ cells and an increase of IL-17 in both DAD groups, with an increased number of granzyme A in H1N1 group ($p<0.05$). **Conclusion:** DAD due to viral A(H1N1)pdm09 is associated with a cytotoxic inflammatory phenotype that is different from non-viral causes of DAD, with partially divergent responses in the parenchyma relative to the small airways. In non-viral DAD, immune cell alterations were found only at the small airway level, reinforcing the role of the small airways in the pathogenesis of the exudative phase of DAD.

Abstract word count: 250

Key Words: Diffuse Alveolar Damage, ARDS, Human Influenza, Pathology, Autopsy.

INTRODUCTION

Diffuse alveolar damage (DAD) is a histological pattern characterized by hyaline membranes, intra-alveolar oedema, alveolar epithelial cell injury, and neutrophilic inflammation. DAD is commonly found in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS), and it is considered a pathological hallmark that is correlated with the severity and duration of the disease (1-3).

DAD can occur as a consequence of different forms of lung insult, such as bacterial and viral infections, connective tissue diseases and sepsis, among others. In addition, the aetiology of DAD has been broadly divided in two groups: lung injury that affects primarily the pulmonary parenchyma (pneumonia, aspiration of gastric contents, inhalation injury); or indirect lung injury in the setting of a systemic process with an acute systemic inflammatory response (sepsis, severe trauma, pancreatitis) (4, 5).

Neutrophils and macrophages have been recognized as the main drivers in the physiopathology of DAD (6), resulting in the release of several cytokines associated with direct injury to the alveolar-capillary membranes. However, other cells from the innate and adaptive immune systems, such as lymphocytes, mast cells, dendritic cells and lymphocytes, also certainly play roles in the pathogenesis of DAD, as shown mainly in animal studies (7, 8). Due to its multiple aetiologies, it is plausible to conceive that the immunopathology is different in the various presentations of DAD.

The pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus emerged in 2009 and spread globally, leading to 284,400 deaths in that year (9). Since then, the virus has circulated worldwide with an *skip-and-resurgence* behaviour in recent years (10). A new outbreak of cases is currently being observed in Brazil, mainly in São Paulo, with 411 confirmed deaths as of May 2016 (11). Severe infection caused by the influenza A(H1N1)pdm09 virus can induce ARDS with a histopathological pattern of DAD associated with bronchiolitis and haemorrhage, as previously shown by our group (12). The clinical course of influenza A(H1N1)pdm09-associated ARDS is different from non-H1N1 ARDS, in which patients require more extensive therapy, including extracorporeal lung support (13).

To date, very few pathological papers have analysed the broad panel of cells related to innate and adaptive immunity in the lungs of critical patients with DAD. We hypothesized that a viral cause of DAD would be associated with the presence of cytotoxicity-associated cells, which would be not present in the non-viral, non-pulmonary causes of DAD, and that small airways would present a different profile than that of the parenchyma. Therefore, the aim of this study was to describe, quantify and compare the immune cells in the alveolar parenchyma and small airways of patients with viral and non-viral causes of DAD.

Some of the results of this study have been previously reported in the form of abstracts (14-17).

METHODS

This study was approved by the institutional review board of São Paulo University Medical School. It was a retrospective study using archived material from routine autopsies performed by the Autopsy Service of the Department of Pathology of Sao Paulo University Medical School.

Study population

Lung tissue from 44 autopsies performed at Sao Paulo University Medical School between 2002 and 2010 was retrospectively included in this study and was divided into three groups according to the cause of death.

The H1N1 group (n=15) was characterized by pulmonary injury due to influenza A(H1N1)pdm09 infection. Viral infection was confirmed by nasopharyngeal swab specimens or in lung tissue using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (rRT-PCR) testing, in accordance with guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

The ARDS group (n=13) was characterized by non-pulmonary ARDS patients with non-viral infection causes of death, with histological findings of DAD (18) and the absence of chronic lung diseases. ARDS was defined accordingly to the Berlin definition (19).

The Control group (n=16) was characterized by a non-pulmonary cause of death among non-smokers and non-ventilated patients and without previous lung diseases. All of these patients showed normal lung architecture on gross and microscopic examinations.

These cohorts have already been described in previous studies (12, 20, 21).

Tissue processing

Paraffin blocks of lung tissue collected during routine autopsy were retrieved from the archives of the Department of Pathology of Sao Paulo University Medical School. Three to four fragments of lung tissue were randomly collected from regions of altered lung parenchyma. In normal lungs, one fragment of lung tissue was collected from each lobe. The tissue was previously fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, routinely processed and embedded in paraffin. Five-micrometre-thick sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) for confirmation of the histological diagnosis of DAD and the identification of small airways.

Morphological analysis and immunohistochemistry

One to three slides per patient containing alveolar septa and small airways were selected for analysis and immunohistochemical staining.

Immunostaining for the following markers was performed: CD8+ T cells, CD4+ T cells, CD83+ dendritic cells, CD207+ Langerhans cells, CD 57+ natural killer cells, chymase+ and tryptase+ mast cells, FOXP3+ regulatory T cells, IL-17+, and granzyme A+ and B+ cells, as previously described (22). Antibody types and the pre-treatments used are shown in table E1, as an online supplement.

After immunohistochemical staining, each slide was scanned using Panoramic Viewer® software, version 1.15.2 for Windows® (3DHistech, Budapest, Hungary).

For the alveolar parenchyma analyses, approximately 20 fields per case were selected for image analysis, with each field containing 1000 µm of alveolar

septum at 500x magnification. Small airways were defined as those showing a basement membrane (BM) perimeter ≤ 6 mm (23). Two to four small airways were analysed per patient, and the density of the inflammatory cells was quantified in each airway. The entire circumference was analysed at 500x magnification.

Marker expression in small airways and parenchyma was assessed using Image-Pro Plus® image-analysis software, version 6.0 for Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

The expression of the different markers in the alveolar septa was calculated as the density of positive cells divided by the corresponding alveolar septum length (cells/ μm) and in the airways as the positive cells divided by the basal membrane perimeter (cells/ μm). All of the slides were previously coded and analysed by two investigators blinded to the study groups. The interobserver correlation was $\kappa=0.81$.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical software package, version 15 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA), and GraphPad Prism software, version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are presented as the means $\pm$ SDs or medians (interquartile ranges). After testing for the distribution of data, *one-way ANOVA* was used to compare data among the H1N1, ARDS and Control groups, with adjustments using Bonferroni's test. The association between cell densities was analysed by Spearman's rank test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Study Population

Demographic and clinical data of the H1N1 (n=15), ARDS (n=13) and Control (n=16) group are presented in Table 1. The mean $\pm$ SD age of the H1N1, ARDS and Control group patients were 50 ± 12 , 43 ± 15 , and 54 ± 15 years old, respectively ($p=0.133$). The main cause of death in the ARDS group was refractory sepsis (46%), and the primary causes of death in the Control group were cardiovascular diseases (56%).

Patients with non-pulmonary ARDS showed the classical histological picture of DAD, characterized by hyaline membranes, intra-alveolar oedema, and neutrophilic exudates. The histological pattern observed in all of the patients was the exudative pattern, with four of them showing an initial proliferative pattern. There was no extensive tissue proliferation or fibrosis. All of the patients were ventilated using a lung-protective strategy with a low tidal volume (≤ 6 mL/Kg); the ventilatory parameters and $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ values of ARDS are presented in Table 2. Three patients presented secondary bronchopneumonia according to the autopsy reports.

All of the patients with influenza A(H1N1)pdm09 infection showed extensive exudative DAD with variable degrees of pulmonary haemorrhage and necrotizing bronchiolitis. Six patients had evidence of bacterial infection in the lungs, confirmed by the presence of positive histochemical staining for bacteria, positive culture in the bronchial aspirate and/or positive PCR. Both PCR and bronchial aspirate cultures detected *Streptococcus pneumoniae* in all of the

patients (12). Patients with normal lung histology were used as controls. Representative histological pictures are shown in Figures 1 and 4 (a, b, c).

Morphological analysis

A mean of 26.4 ± 8.1 mm of alveolar septum was analysed by staining for each patient. There were no differences in total septum length among the H1N1, ARDS and Control groups (25.7 ± 7.4 mm, 28.3 ± 5.2 mm, 25.3 ± 10.6 mm, respectively, $p=0.583$).

Because of extensive necrotizing bronchiolitis in the H1N1 patients and extensive tissue use for the other groups, not all of the cases had the same number of small airways analysed, with some cases having no airways suitable for analysis. A total of 1161 small airways were analysed considering all of the stainings used, in Control $n=7$, ARDS, $n=10$ and H1N1 $n=7$ cases. The mean perimeters of the small airways for the H1N1, ARDS and Control groups were 2.4 ± 0.6 mm, 2.3 ± 0.7 mm, 2.1 ± 0.9 mm, respectively, corresponding to small membranous bronchioles ($p=0.70$).

In lung parenchyma analysis, there was a significantly higher expression of CD8+ T cells, CD4+ T cells, and CD83+ dendritic cells in the H1N1 group compared to the ARDS and Control groups. In addition, there was higher expression of granzyme A+ cell density in the H1N1 group, compared to the Control group. CD57+ cell density was increased in the H1N1 group, compared to the ARDS group. Figures 1 to 3 shows representative lung parenchyma samples and data for the H1N1, ARDS and Control groups, respectively.

Table 3 shows lung parenchyma analysis data for the H1N1, ARDS and Control groups. There were no significant differences among the groups in the

expression of chymase+ and tryptase+ mast cells, granzyme B+, IL-17 or CD20+ B cells.

In small airway analysis, there was significantly decreased expression of CD83+ dendritic cells in the H1N1 group, compared to the controls. There was decreased expression of tryptase+ mast cells and CD207+ cells in the H1N1 and ARDS groups, compared to the controls. Conversely, IL-17+ was increased in the H1N1 and ARDS groups compared to the Control group, and granzyme A+ cell density was increased in the H1N1 group, compared to the ARDS and Control groups. Figures 4, 5 and 6 show representative samples of the small airways and data for the H1N1, ARDS and Control groups, respectively.

Table 4 shows small airway analysis data for the Control, ARDS and H1N1 groups. There were no significant differences among the groups in the expression of CD8+ T cells, CD4+ T cells, CD57+ NK cells, chymase+ mast cells, granzyme B or CD20+ B cells.

The density of positive cells for Foxp3+ was very low in all of the samples and therefore was not quantified; the same finding occurred for CD207 relative to the alveolar parenchyma.

There were no differences between patients with the exudative and initial proliferative histological patterns when the cellular analysis and clinical and ventilatory parameters in the ARDS group ($p>0.05$) were compared, data not shown. In addition, no statistical differences were found when cases with bronchopneumonia in both H1N1 and ARDS groups were compared with cases without bronchopneumonia ($p>0.05$), data not shown.

Morphological correlations

There was a positive correlation of the cell density of granzyme A+ cells with CD8+ cells ($r=0.929$; $p=0.003$) and CD4+ cells ($r=0.886$; $p=0.019$) in the small airways of H1N1 patients. Interestingly, there was a positive correlation between IL17+ cells and granzyme A+ cells both in the airways ($r=0.829$; $p=0.042$) and parenchyma ($r=0.714$; $p=0.006$) in this group. The correlations are shown in Figure 7.

There were no significant correlations between immune cells and clinical/ventilatory parameters in the ARDS group.

DISCUSSION

In the present study, we analysed a broad panel of cells related to innate and adaptive immunity in the lungs of critical patients with DAD. Our main finding was that DAD due to influenza A(H1N1)pdm09 virus infection was associated with an inflammatory phenotype different from non-viral causes of DAD, with partially divergent responses in the parenchyma relative to the airways. There was significantly higher expression of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, dendritic cells, granzyme A+, and NK cell density in the parenchyma of patients who died from influenza A(H1N1)pdm09 DAD, and there was lower cell density of tryptase+ mast cells dendritic+ cells and an increased number of granzyme A and IL-17+ cells in the airways, compared to non-viral DAD cases and the controls. These findings extend our previous description of the immunopathology on influenza A(H1N1)pdm09 severe lung infection, adding quantitative parameters to a broad cellular panel of immune cells, compared to other causes of DAD in different lung compartments.

In contrast, no significant changes in immune cells at the parenchymal level were observed in non-viral DAD cases compared to the controls. Interestingly, the only observed differences were at the small airway level, with decreased cell density of tryptase+ mast cells and CD207+ Langerhans cells and an increase in IL-17+ cells. The lack of significant immune cell alterations at the parenchyma level in non-viral DAD cases could be explained by most of them having an extrapulmonary etiology with primary immunological phenomena not occurring in the lungs. To our knowledge, this study was the first to compare immune cell infiltration in the parenchyma and airways of patients with DAD of different aetiologies.

As expected, immune responses in influenza A(H1N1)pdm09-associated DAD presented cytotoxic characteristics with increases in CD8+ T cells and NK+ cells in the parenchyma region and granzyme A+ cells in both the airways and parenchyma. Granzymes are a family of five serine proteases present in the granules of cytotoxic cells, which require perforin to exert their cytotoxic activities, inducing apoptosis by different pathways. Granzyme A+ is more abundant, but granzyme B+ has more potent cytotoxic activity (24). We previously described the presence of granzyme B+ cells in the lungs of these patients (12), but the current quantitative analysis showed that granzyme A+ was actually increased in both the parenchyma and SA, with strong correlations with CD4+ and CD8+ cells in the airways. Harari et al previously described in humans the blood profiles of CD8 T cells specific to influenza viruses, showing that CD8+ T cells were mostly perforin⁻, granzyme K⁺, granzyme A^{+/-}, and granzyme B⁻ and that granzyme A was not associated with a cytotoxic profile (25). Hirota et al previously described the presence of increased granzyme B+

cells in the lungs of ARDS patients derived from biopsies and autopsies, but the causes of ARDS were not presented in their paper (7). Whether the observed granzyme profiles of influenza A(H1N1)pdm09 cases and of the airways of ARDS patients were associated with less potent cytotoxic capacity and, therefore, with increased disease severity deserves further investigation.

There was a divergent pattern in the density of dendritic cells in A(H1N1)pdm09-associated DAD in the parenchyma vs. the airways. Whereas an increase in CD83+ mature dendritic cells (DCs) were observed in the parenchyma, SA presented a decrease in CD83+ DCs relative to the controls and a decrease in CD207+ Langerhans DCs relative to the controls and to non-viral DAD. This pattern was previously described in an experimental model of influenza A infection in mice, in which depletion was observed in CD11b+ and CD11b2 myeloid DC subsets in the airway mucosa at day 4 of infection, returning to baseline by day 14 post-infection (26). In the parenchyma, DCs were significantly elevated at day 14 and remained so until day 21 post-infection. Because airway DCs tend to have first contact with aeroallergens, it has been speculated that this early decrease is due to enhanced migration to draining LNs or apoptosis. Parenchymal DCs in the alveolar walls would represent a distinct microenvironment, which would be important in the later phases of infection, regulating T cell immunity (27). Additionally, an *in vitro* study showed that H1N1 virus infection, in contrast to other seasonal influenza viruses, is associated with impaired dendritic cell maturation (28). To our knowledge, this study was the first to show a similar phenomenon in human tissue.

We found decreased cell density of tryptase+ mast cells in the small airways of both DAD groups. Mast cells are important cells in the surveillance of infection, and H1N1 virus can infect mast cells, stimulating the release of cytokines and chemokines (29). In contrast, Liu et al showed that H1N1 virus induced mast cell apoptosis, which could explain our findings (30). In non-viral DAD, the reasons for the decreased mast cell density in the airways are not clear. Interestingly, no changes at the parenchymal level were observed in any of the groups. These results could be explained by our cases being mostly exudative or early proliferative cases. Liebler et al previously analysed ARDS cases in different histological stages, reporting that mast cells were increased only at a later fibroproliferative stage, and they suggested that these cells were not implicated in fibrogenesis (31).

IL-17 is known to be involved in the early pathogenesis of both viral and non-viral DAD, mainly due to its capacity to regulate neutrophil influx. Increased levels of IL-17 in the lungs are believed to be an early indicator of disease severity in H1N1 virus infection(32-34). Indeed, we found increased levels of IL-17 in both groups but surprisingly only at the small airway level. Our finding reinforced the contribution of bronchioles to the pathogenesis of acute interstitial diseases by secreting cytokines, granzyme A and inflammatory mediators involved in the early phases of acute lung injury (20, 21).

This study had several limitations. Due to its retrospective character, we had limited access to clinical data at the time of death, especially from the A(H1N1)pdm09 cases, because some of the patients presented with very severe disease and died within a few days in other institutions (12), and they were referred to our service for autopsy. Furthermore, we analysed lung tissue

from patients who developed severe disease, which might have presented differently in less severe cases of DAD and could explain the lack of significant clinical-morphological correlations. In both DAD groups we had cases with secondary bacterial infection, which might have influenced the results. Nevertheless, we were able to identify a cytotoxic profile compatible with viral infection in H1N1 cases.

In summary, we described the immune cellular profiles of DAD cases due to viral A(H1N1)pdm09 and non-viral DAD in fatal cases. The H1N1 group had a cellular cytotoxic profile at the parenchymal level, with a divergent pattern of dendritic and mast cell depletion at the small airway level. Significant immune cell alterations were present only at the small airway level in non-viral DAD cases, reinforcing the role of small airways in the pathogenesis of exudative ARDS. Autopsy material is a unique material that, by providing access to different parts of the lungs, enhanced our understanding of the immune processes occurring in DAD. Our results indicate that the more severe clinical course of H1N1 patients with ARDS in relation to other causes of ARDS can be related to the extensive cytotoxic inflammation present in these lungs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the technicians of the histology and immunohistochemistry laboratories. We also thank the Autopsy Service of São Paulo University for its technical support.

REFERENCES

1. Katzenstein AL, Colin M, Leibow AA. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol* 1976;85:209-228.
2. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-1349.
3. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodriguez JM, Aramburu JA, Peñuelas O, Cortés-Puch I, Cardinal-Fernández P, Lorente JA, Frutos-Vivar F. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:761-767.
4. Castro CY. ARDS and diffuse alveolar damage: a pathologist's perspective. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2006;18:13-19.
5. Parambil JG, Myers JL, Aubry MC, Ryu JH. Causes and prognosis of diffuse alveolar damage diagnosed on surgical lung biopsy. *Chest* 2007;132:50-57.
6. Matthay MA, Zemmans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol* 2011;6:147-163.
7. Hirota JA, Hiebert PR, Gold M, Wu D, Graydon C, Smith JA AK, McNagny K, Granville DJ, Knight DA. Granzyme B deficiency exacerbates lung inflammation in mice after acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:453-462.
8. Mock JR, Garibaldi BT, Aggarwal NR, Jenkins J, Limjunyawong N, Singer BD, Chau E, Rabold R, Files DC, Sidhaye V, Mitzner W, Wagner EM, King LS, D'Alessio FR. Foxp3+ regulatory T cells promote lung epithelial proliferation. *Mucosal Immunol* 2014;7:1440-1451.

9. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, Bandaranayake D, Breiman RF, Brooks WA, Buchy P, Feikin DR, Fowler KB, Gordon A, Hien NT, Horby P, Huang QS, Katz MA, Krishnan A, Lal R, Montgomery JM, Mølbak K, Pebody R, Presanis AM, Razuri H, Steens A, Tinoco YO, Wallinga J, Yu H, Vong S, Bresee J, Widdowson MA. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 2012;12:687-695.
10. He D, Lui R, Wang L, Tse CK, Yang L, Stone L. Global Spatio-temporal Patterns of Influenza in the Post-pandemic Era. *Sci Rep* 2015;5:11013.
11. Brazilian epidemiologic report—influenza A (H1N1) 2016. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/09/informe-epid-influenza-se17-2016pdf>; [accessed May 23, 2016].
12. Mauad T, Hajjar LA, Callegari GD, da Silva LF, Schout D, Galas FR, Alves VA, Malheiros DM, Auler JO Jr, Ferreira AF, Borsato MR, Bezerra SM, Gutierrez PS, Caldini ET, Pasqualucci CA, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:72-79.
13. Töpfer L, Menk M, Weber-Carstens S, Spies C, Wernecke KD, Uhrig A, Lojewski C, Jörres A, Deja M. Influenza A (H1N1) vs non-H1N1 ARDS: analysis of clinical course. *J Crit Care* 2014;29:340-346.
14. Buttignol M, Pires-Neto R, Ballarin M, Dolhnikoff M, Mauad T. CD8+ T cells, dendritic cells, mast cells and FOXP3 in the lungs of patients with severe influenza A (H1N1) infection [abstract]. *Eur Respir J* 2014;44:58.
15. Buttignol M, Pires-Neto R, Ballarin M, Dolhnikoff M, Mauad T. T and B lymphocytes, NK-cells, dendritic cells, mast cells and foxp3+ cells in lung tissue of severe Influenza A (H1N1)pdm infection [abstract]. *Eur Respir J* 2015;46:23.

16. Buttignol M, Pires-Neto R, Ballarin M, Rodio G, Dolhnikoff M, Mauad T. Influenza A (H1N1) virus infection is associated with increased number of CD8T+ lymphocytes and CD83+ dendritic cells in lung tissue [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;A4172.
17. Buttignol M, Pires-Neto R, Rossi e Silva RC, Ballarin M, Dolhnikoff M, Mauad T. Immunopathology of the Airways in Severe Influenza A (H1N1)pdm Infection [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;A4862.
18. Katzenstein A-L A. Katzenstein and Askin's surgical pathology of non-neoplastic lung disease. Major problems in pathology. Philadelphia: Edinburgh; 2006.
19. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012 307:2526-2533.
20. Morales MM, Pires-Neto RC, Inforsato N, Lanças T, da Silva LF, Saldiva PH, Mauad T, Amato MB, Dolhnikoff M. Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue. *Crit Care* 2011;15:R4.
21. Pires-Neto RC, Morales MM, Lancas T, Inforsato N, Duarte MI, Amato MB, de Carvalho CR, da Silva LF, Mauad T, Dolhnikoff M. Expression of acute-phase cytokines, surfactant proteins, and epithelial apoptosis in small airways of human acute respiratory distress syndrome *J Crit Care* 2013;28:111.e9-111.e15.
22. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Ferneztian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* 2008 32:61-69.

23. Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:857-862.
24. Moffat JM, Gebhardt T, Doherty PC, Turner SJ, Mintern JD. Granzyme A expression reveals distinct cytolytic CTL subsets following influenza A virus infection. *Eur J Immunol* 2009;39:1203-1210.
25. Harari A, Bellutti Enders F, Cellerai C, Bart PA, G P. Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure. *J Virol* 2009 83:2862-2871.
26. Strickland DH, Fear V, Shenton S, Wikstrom ME, Zosky G, Larcombe AN, Holt PG, Berry C, von Garnier C, Stumbles PA. Persistent and compartmentalised disruption of dendritic cell subpopulations in the lung following influenza A virus infection. *PLoS One* 2014;9:e11152.
27. Unkel B, Hoegner K, Clausen BE, Lewe-Schlosser P, Bodner J, Gattenloehner S, Janßen H, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S. Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia. *J Clin Invest* 2012;122:3652-3664.
28. Chin R, Earnest-Silviera L, Gordon CL, Olsen K, Barr I, Brown LE, Jackson DC, Torresi J. Impaired dendritic cell maturation in response to pandemic H1N109 influenza virus *J Clin Virol* 2013;56:226-231.
29. Graham AC, Hilmer KM, Zickovich JM, Obar JJ. Inflammatory response of mast cells during influenza A virus infection is mediated by active infection and RIG-I signaling *J Immunol* 2013;190:4676-4684.

30. Liu B, Meng D, Wei T, Zhang S, Hu Y, Wang M. Apoptosis and pro-inflammatory cytokine response of mast cells induced by influenza A viruses. *PLoS One* 2014;9:e100109.
31. Liebler JM, Qu Z BB, Powers MR, Rosenbaum JT. Fibroproliferation and mast cells in the acute respiratory distress syndrome *Thorax* 1998;53:823-829.
32. Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, Ross TM, Witztum JL, Kolls JK. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J Immunol* 2009;183:5301-5310.
33. Muir R, Osbourn M, Dubois AV, Doran E, Small DM, Monahan A, O'Kane CM, McAllister K, Fitzgerald DC, Kissenpfennig A, McAuley DF, Ingram RJ. Innate Lymphoid Cells Are the Predominant Source of IL-17A during the Early Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:407-416.
34. Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramírez P, Martin-Loeches I, Varillas D, Gallegos MC, Serón C, Micheloud D, Gomez JM, Tenorio-Abreu A, Ramos MJ, Molina ML, Huidobro S, Sanchez E, Gordón M, Fernández V, Del Castillo A, Marcos MA, Villanueva B, López CJ, Rodríguez-Domínguez M, Galán JC CR, Liétor A, Rojo S, Eiros JM, Hinojosa C, Gonzalez I, Torner N, Banner D, Leon A, Cuesta P, Rowe T, Kelvin DJ. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care* 2009;13:R201.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Representative H&E photomicrographs of the lung parenchyma from the Control, ARDS, and H1N1 groups (a, b, c) and immunohistochemistry for CD8+ T cells (d, e, f) and CD4+ T cells (g, h, i). We observed the presence of hyaline membranes (hm) in the ARDS group and inflamed and oedematous alveolar septa with hyaline membranes (hm) in the H1N1 group. There was increased expression of CD8+ T cells and CD4+ T cells in the H1N1 group compared to the ARDS and Control groups (arrows). Scale bar=100 µm.

Figure 2. Representative photomicrographs of the lung parenchyma from the Control, ARDS and H1N1 groups, stained immunohistochemically with CD83 (a, b, c), granzyme A (d, e, f) and CD57 (g, h, i) antibodies. There was increased expression of CD83+ dendritic cells in the H1N1 group compared to the ARDS and Control groups; increased granzyme A+ cells in the H1N1 group, compared to the Control group; and increased expression of CD57+ cells in the H1N1 group, compared to the ARDS group (arrows). Scale bar=100 µm.

Figure 3. Positive cell densities in the lung parenchyma. Graphs show the density of CD4+ T cells, CD8+ T cells, CD57+ NK cells, granzyme A+ cells, and CD83+ dendritic cells in the parenchyma of the H1N1, ARDS and Control groups.

Figure 4. Representative photomicrographs of the small airways from the Control, ARDS and H1N1 groups, stained with H&E (a, b, c) and immunohistochemistry for CD83 (d, e, f) and mast cell tryptase (g, h, i). We observed small airway (br) oedema with epithelial denudation and the presence of inflammatory cells in the bronchioles (br) in the ARDS (b) and H1N1 (c) groups. There was decreased expression of CD83+ dendritic cells in the H1N1

group compared to the controls and decreased expression of tryptase+ mast cells in the H1N1 and ARDS groups, compared to the controls (arrows). Scale bar=100 μ m.

Figure 5. Representative photomicrographs of the small airways from the Control, ARDS and H1N1 groups, stained immunohistochemically with CD207 (a, b, c), IL-17 (d, e, f) and granzyme A (g, h, i) antibodies. There was decreased expression of CD207+ cells in the H1N1 and ARDS groups compared to the controls, increased expression of IL-17 in the H1N1 and ARDS groups compared to the controls and increased expression of granzyme A+ cells in the H1N1 group compared to the controls (arrows). Scale bar=100 μ m.

Figure 6: Positive cell densities in the small airways. Graphs show the density of CD83+ dendritic cells, tryptase+ mast cells, CD207+ Langerhans cells, IL-17+, and granzyme A+ cells in the small airways of the H1N1, ARDS and Control groups.

Figure 7: Graphs show the positive correlations between the cell density of granzyme A+ and CD8+ cells (A), granzyme A+ and CD4+ cells (B), and granzyme A+ and IL-17+ cells (C) in the small airways of H1N1 patients and positive correlations between the cell density of granzyme A+ and IL-17+ cells (D) in the lung parenchyma of H1N1 patients (Spearman's test).

Table 1 – Demographic and clinical data

Characteristics	Control (n=16)	ARDS (n=13)	H1N1 (n=15)
Age (years)	54±15	43±15	50±12
Sex (male/female)	9/7	5/8	9/6
Primary cause of death, n (%)			
Respiratory failure	-	4 (30)	11(73)
Cardiovascular diseases	9 (56)	-	2 (13)
Liver diseases	4 (25)	-	-
Refractory sepsis	-	6 (46)	2 (13)
Gastrointestinal disease	2 (12)	-	-
Gastrointestinal bleeding	1 (6)	3 (23)	-

Table 2 - Days of evolution, ventilatory parameters, PaO₂/FiO₂ values and predisposing factors for acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients

Patient	Days of ARDS	Driving pressure cm H ₂ O	PEEP cm H ₂ O	PaO ₂ /FiO ₂	Predisposing factors
1	1	10	8	161	Acute fulminant hepatitis
2	1	6	6	170.7	Cirrhosis
3	1	12	9	93.7	Lupus erythaematosus with hypovolaemic shock
4	2	25	10	166.3	Chronic pancreatitis with cholangitis
5	2	15	8	130.8	Cirrhosis; diarrhoea
6	2	13	14	156.5	Disseminated lymphoma
7	2	10	11	111.7	Myelitis
8	3	20	18	84	Cirrhosis
9	4	14	11	197	Multiple myeloma, acute gastrointestinal bleeding
10	6	15	10	196.7	Acute mesenteric ischaemia
11	9	12	17	119.7	Infectious endocarditis
12	10	16	14	108.3	Cirrhosis with variceal bleeding
13	16	10	10	186.7	Inguinal abscesses with peritonitis
Mean ± SD	4.5 ± 4.5	13 ± 4.7	11 ± 6.2	144 ± 39	

Days of ARDS: mean period from ARDS diagnosis until death. PEEP corresponds to mean values in the first 48 hours. PaO₂/FiO₂: ratio of arterial oxygen tension to the fraction of inspired oxygen; PEEP: positive end-expiratory pressure. PaO₂/FiO₂ corresponds to values assessed at the time of clinical diagnosis for each patient.

Table 3 – Cell densities of studied markers in the lung parenchyma of the Control, ARDS and H1N1 groups.

Markers (cells10 ³ /μm)	Control	ARDS	H1N1
CD4	1 [0.9]	0.4 [0.8]	1.4 [1.9]*
CD8	3.7 [1.7]	3.7 [1.9]	6.6 [3.4]*
CD20	0.6 [0.6]	0.4 [0.7]	0.7 [0.5]
CD 57	3 [2.2]	2 [1.2]	3.5 [3.5]°
Granzyme B	5.6 [5.6]	7.2 [4.3]	7.5 [6.3]
Granzyme A	6.8 [7.6]	7.3[6]	10.2 [10.2]†
Chymase mast cells	0.5 [0.8]	0.6 [0.6]	0.6 [1.8]
Tryptase mast cells	3 [1.6]	2 [2]	2.9 [2]
CD83	0.5 [0.5]	0.8 [0.8]	1.5 [1.4]*
IL-17	15 [13.5]	15.2 [7.2]	18 [8.4]

Values are expressed as medians [IQRs]

* p <0.05 H1N1 group compared to the ARDS and Control groups

° p< 0.05 H1N1 group compared to the ARDS group

† p <0.05 H1N1 group compared to the Control group

Table 4 – Cell densities of studied markers in the small airways of the Control, ARDS and H1N1 groups

Markers (cells10 ³ /μm)	Control	ARDS	H1N1
CD4	17.6 [17.2]	13.3 [16.1]	22.7 [34.4]
CD8	17.2 [16.6]	31.1[27.6]	37 [67.8]
CD20	8.1[16.5]	3.6 [9.6]	9.4 [10.2]
CD 57	5.6 [2.2]	2.9 [1.4]	3.4 [2.4]
Granzyme B	33.2 [16.1]	30.9 [22.5]	39.5 [38.3]
Granzyme A	8.6 [8.4]	7.6 [14.3]	32 [38.9] [°]
Chymase mast cells	8.8 [7.5]	6.8 [5.2]	5.8 [6.9]
Tryptase mast cells	20.3 [13.3]	14.7 [9.7]	14.1 [7.5]*
CD207	2.9 [2.7]	0.9 [1.4]	0.4 [1.6]*
CD83	14.5 [10.1]	12.2 [7.1] [†]	6.6 [5.4] [†]
IL-17	9.2 [3.7]	20.7 [16.4]	20.9 [22]*

Values are expressed as medians [IQRs]

[°] p <0.05 H1N1 group compared to the ARDS and Control groups

* p <0.05 Control group compared to the H1N1 and ARDS groups

[†] p <0.05 H1N1 group compared to the Control group

Online supplement

Table E1

Antibodies and processing used in immunohistochemical analyses

Antibody	Pre-treatment	Clone	Dilution	Origin
CD4	Citrate	aB12	1:200	Novocastra, Benton Lane/United Kingdom
CD8	Citrate	C8/144B	1:400	Dako, Glostrup/Denmark
CD20	Citrate	L 26	1:20,000	Dako, Glostrup/Denmark
CD57	Citrate	TB01	1:200	Dako, Glostrup/Denmark
Granzyme B	Citrate	polyclonal	1:4000	Spring Bioscience, California/USA
Granzyme A	Citrate	GA-6	1:100	Sanquim, Amsterdam/The Netherlands
Chymase	Citrate	cc1	1:5000	Novocastra, Benton Lane/United Kingdom
Tryptase	Citrate	AA1	1:20,000	Dako, Glostrup/Denmark
CD83	Tris-Citrate	1H4B	1:100	Vector Laboratories, California/USA
CD207	Citrate	12D6	1:600	Abcam, Cambridge/United Kingdom
IL-17	Citrate	polyclonal	1:3000	R&D, Minneapolis/USA
Foxp3	Citrate	236A/E7	1:200	Abcam, Cambridge/United Kingdom