



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CAROLINE BUSATTA VAZ DE PAULA

**PAPEL DAS CITOCINAS IL-4/IL-13/TGF- β
ASSOCIADAS AO REMODELAMENTO TECIDUAL
PULMONAR EM PACIENTES INFECTADOS POR
SARS-CoV-2**

CURITIBA 2021

CAROLINE BUSATTA VAZ DE PAULA

**PAPEL DAS CITOCINAS IL-4/IL-13/TGF- β
ASSOCIADAS AO REMODELAMENTO TECIDUAL
PULMONAR EM PACIENTES INFECTADOS POR
SARS-CoV-2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lúcia de Noronha
Coordenadora: Prof^a. Dra. Cristina Pellegrino Baena

CURITIBA 2021

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB-9/1636

P324p
2021 Paula, Caroline Busatta Vaz de
Papel das Citocinas IL-4/IL-13/ TGF- β associadas ao remodelamento
tecidual pulmonar em pacientes infectados por SARS-CoV-2 / Caroline Busatta
Vaz de Paula ; orientadora: Lúcia de Noronha ; coorientadora: Cristina Pellegrino
Baena. -- 2021
71 f. : il. ; 30 cm

Tese doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2021.
Inclui bibliografia

1. Ciências da saúde. 2. Alvéolos pulmonares. 3. Fibrose pulmonar. 4.
Barreira alveolocapilar. 5. Macrófagos. 6. Betacoronavirus. I. Noronha, Lúcia de.
II. Baena, Cristina Pellegrino. III, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título

CD D. 20.ed. – 610



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **20 dias do mês de maio de 2021 às 13:00**, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese **“PAPEL DAS CITOCINAS IL-4/IL-13/TGF- β ASSOCIADAS AO REMODELAMENTO TECIDUAL PULMONAR EM PACIENTES INFECTADOS POR SARS-CoV-2”** apresentado por **Caroline Busatta Vaz de Paula** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Lucia de Noronha - Presidente	
Profa. Dra. Andréa Novais Moreno Amaral (PUCPR)	
Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR)	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza (UFPR)	
Profa. Dra. Meri Bordignon Nogueira (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Lucia de Noronha

Conceito: APROVADA

Profa. Dra. Andréa Novais Moreno Amaral

Conceito: APROVADA

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior

Conceito: APROVADA

Prof. Dr. Cleber Machado de Souza

Conceito: APROVADA

Profa. Dra. Meri Bordignon Nogueira

Conceito: APROVADA

Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Lucia de Noronha
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho à pequena Mirela,
minha inspiração diária. Ao meu marido que
muito me apoiou e incentivou a realizá-lo.
Aos meus pais, alicerces da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carmem e Sebastião, por sempre estarem ao meu lado, por não medirem esforços, independentemente à situação. Vocês são luz, puro amor!

À minha filha Mirela, meu pequeno grande amor, que me motiva constantemente a ser uma pessoa melhor!

Ao Eduardo, meu marido, companheiro e amigo! Suas palavras de apoio e incentivo me encorajaram a estar onde estou! Muito obrigada!

À Lucia de Noronha. Obrigada por acreditar em mim, a não medir esforços nem tempo para ensinar os caminhos da pesquisa científica! Obrigada pelas conversas, risadas, por ser quem é. Para sempre serei grata!

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Experimental! Agradeço ao Seigo por sua amizade, paciência, companheirismo, por me auxiliar no dia a dia. À Marina, amiga que tanto admiro, por sua alegria contagiante, por me escutar e me apoiar. À Ana Paula, obrigada pelas risadas e conversas, você é única. À Ana Paula “Estagiária”, agradeço por dispor seu tempo a nos ajudar.

Ao Felipe Dezidério, amigo querido que está sempre disponível, seja para conversas, correções de textos, artigos... É muito bom tê-lo em minha vida!

Aos integrantes do grupo “Biópsias Pandemia”, vocês são demais! Um grupo multidisciplinar que agregou muitos conhecimentos ao longo de 2020!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, professores e colaboradores, por executar com êxito a difusão da ciência.

À minha amiga, irmã, Célia! Você é uma das pessoas com o coração mais lindo que conheço. Obrigada por sua amizade singela, por me ouvir tantas e tantas vezes, por me incentivar, por sua coragem.

À Ana Paula Iwamura, amiga que a maternidade me deu! Obrigada pelas infinitas conversas e trocas de conhecimento.

À Caroline Rizzo, irmã que a vida me presenteou e que está sempre ao meu lado independente à situação!

Aos meus sogros, Soeli e Régis, que compreendem o que faço e que estão sempre presentes em nossas vidas!

Aqueles que partiram, mas que deixaram em meu coração uma grande lição. Nós temos o hoje, o agora!

A Deus, pelo dom da vida e do amor!

EPÍGRAFE

***“Por vezes sentimos que aquilo
que fazemos não é senão uma gota
de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.”***

Madre Teresa de Calcutá

Resumo

A doença do novo coronavírus, COVID-19, tem levado à morte milhares de pessoas no mundo. No ambiente pulmonar, o vírus utiliza como porta de entrada o receptor da Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), presente na membrana celular do hospedeiro, provocando a morte principalmente dos pneumócitos tipo II, o que contribui com a indução da resposta inflamatória. O dano alveolar difuso, decorrente de uma reação inflamatória intensa, tem sido observado tanto na infecção causada pelo vírus associado à Síndrome Respiratória Aguda Grave - SARS-CoV-2, (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), assim como é destacado em casos de Influenza A, subtipo H1N1 pandêmico (H1N1pdm09), acarretando quadro de fibrose pulmonar.

Objetivo: Avaliar a expressão tecidual da Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 13 (IL-13) e Fator Transformador de Crescimento - beta (TGF- β), além da presença de macrófagos com o fenótipo M2 (*Sphingosine-1*), no processo de remodelamento e fibrose, em amostras pulmonares de biópsias *post mortem* de pacientes que foram a óbito por COVID-19. **Métodos:** Foram utilizadas seis amostras de pulmões obtidas de biópsias de pacientes que foram a óbito por COVID-19 (Grupo COVID-19), dez amostras de pulmões de adultos que morreram por infecção severa decorrente de influenza A, subtipo H1N1pdm09 (Grupo H1N1) e onze amostras de pacientes que foram a óbito por causas diversas, sem lesão pulmonar (Grupo Controle). Tais amostras foram submetidas à técnica de imunohistoquímica, a fim de se quantificar a imunoexpressão das citocinas IL-4, IL-13, TGF- β , além de se avaliar a quantidade (escore) de macrófagos com fenótipo M2 (*Sphingosine-1*). **Resultado:** Um aumento da imunoexpressão tecidual de IL-4 foi identificado no grupo COVID-19 quando comparados ao Grupos H1N1 e Controle, bem como foi observado um escore significativamente maior de macrófagos com fenótipo M2 (*Sphingosine-1*) no Grupo COVID-19, quando comparado ao Grupo Controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão tecidual de IL-13 no Grupo COVID-19 quando comparado ao Grupo Controle, porém notou-se que esta interleucina foi significativamente maior no Grupo H1N1 em relação ao Grupo COVID-19. A imunoexpressão tecidual de TGF- β não apresentou diferenças estatísticas ao se testar os três grupos. **Conclusão:** Uma maior imunodeteção de IL-4 e escore de macrófagos M2 foram identificados nas amostras pertencentes ao Grupo COVID-19, indicando que a resposta Th2 poderia estar precocemente ativada. Além de ser ineficiente no processo de eliminação viral, uma vez ativada, esta via induz ao processo de remodelamento tecidual, com o desenvolvimento de fibrose pulmonar.

Palavras-chave: Dano alveolar difuso; IL-4; IL-13; Fibrose; Macrófagos M2; SARS-CoV-2; TGF- β ;

Abstract

The disease of the new coronavirus, COVID-19, has killed thousands of people worldwide. In the pulmonary environment, the virus uses the Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ECA-2) enzyme receptor as a gateway, present in the host cell membrane, causing the death, mainly, of type II pneumocytes, contributing to the induction of the response inflammatory. Diffuse alveolar damage, resulting from an intense inflammatory reaction, has been observed both in the infection, associated by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), as well as it is highlighted in cases of Influenza A, subtype H1N1 pandemic (H1N1pdm09), causing lung fibrosis. **Objective:** To evaluate the tissue expression of Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 13 (IL-13) and, Transforming Growth Factor - beta (TGF- β), besides to score the macrophages with the M2 (Sphingosine-1) phenotype, present in the process of tissue remodeling and fibrosis, in pulmonary samples of post-mortem biopsies from patients who died by COVID-19. **Methods:** Six lung samples obtained from biopsies of patients who died by COVID-19 (COVID-19 Group), ten samples of lungs from adults who died from severe infection due to Influenza A, subtype H1N1pdm09 (Group H1N1) and eleven samples from patients who died from different causes, without lung injury (Control Group) were analyzed. The samples were submitted to the immunohistochemistry technique, to quantify the immunoexpression of IL-4, IL-13, TGF- β , in addition to evaluating the score of macrophages with M2 phenotype (Sphingosine-1) **Result:** An increase in IL-4 tissue immunoexpression was identified in the COVID-19 group when compared to the H1N1pdm09 and Control group, as well as a significantly higher score of macrophages with M2 phenotype (Sphingosine-1) in the COVID-19 group, when compared to the Control Group. No statistical difference was observed for IL-13 in the COVID-19 Group when compared to the Control Group, but it was noted that this interleukin was significantly higher in the H1N1 Group compared to the COVID-19 Group. TGF- β tissue immunoexpression did not show statistical differences when testing the three groups. **Conclusion:** Greater IL-4 immunodetection and M2 macrophage score were identified as belonging to the COVID-19 Group, indicating that the Th2 response was activated. In addition to being inefficient in the process of viral elimination, once activated, this pathway may induce the early process of tissue remodeling, with the development of pulmonary fibrosis.

Keywords: Diffuse alveolar damage; IL-4; IL-13; Fibrosis; M2 macrophages; SARS-CoV-2; TGF- β .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infecção SARS-CoV-2, Tempestade de citocinas	16
Figura 2. Mecanismo de lesão pulmonar na COVID-19	18
Figura 3. Remodelamento tecidual	20
Figura 4. Fluxograma das amostras de COVID-19.....	23
Figura 5. Fluxograma com critérios de inclusão e exclusão	24
Figura 6. Análise morfométrica.....	28
Figura 7. Escore de Allred	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ang II - Angiotensina II

Cav 1 - Caveolina 1

CD44v6 - Glicoproteína transmembranar

CDC - Centro de Controle e Prevenções de Doenças, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*

CGA - Campo de Grande Aumento

CONEP - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

COVID-19 - Doença por Coronavirus 2019, do inglês *Coronavirus Disease 2019*

COX-2 - Ciclo-oxigenase 2

CTGF - Fator de Crescimento do Tecido Conectivo

ECA-2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2

HC - Hospital de Clínicas

H&E - Hematoxilina e Eosina

H1N1pdm09 - Influenza A, subtipo H1N1 pandêmico de 2009

Ig - Imunoglobulina

IgE - Imunoglobulina tipo E

IHQ - Imunohistoquímica

IL-1 - Interleucina 1

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

IL-1Ra - Antagonista do Receptor de Interleucina 1

IL-4R α - Receptor Alfa de Interleucina 4

INF- α - Interferon - alfa

INF- β - Interferon - beta

M2 - Fenótipo de macrófago M2

MEC - Matriz Extra Celular

MMP - Metaloproteinase de Matriz

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PGE2 - Prostaglandina E2

PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrões

R0 - Taxa de Transmissibilidade

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SARS-CoV-2 - Síndrome respiratória Aguda Grave devido ao Coronavírus tipo 2 do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SRAG - Síndrome Respiratória Aguda Grave

SRA - Sistema Renina-Angiotensina

ssRNA - Ácido ribonucleico de fita simples

TCLA - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β - Fator Transformador de Crescimento - beta

Th1 - Linfócitos *T-helper* 1

Th2 - Linfócitos *T-helper* 2

TMPRSS2 - Protease Serina 2 Transmembrana Celular, do inglês *Transmembrane Protease Serine 2*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral - alfa

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

α - SMA - Alfa-actina de Músculo Liso

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	13
2.0 OBJETIVO GERAL	22
2.1 Objetivos Específicos	22
3.0 METODOLOGIA.....	23
3.1 Grupo COVID-19	23
3.1.1 Amostras pulmonares do Grupo COVID-19	23
3.2 Grupo H1N1	25
3.2.1 Amostras pulmonares do Grupo H1N1	25
3.3 Grupo Controle.....	26
3.3.1 Amostras pulmonares do Grupo Controle	26
3.4 Análises Histológicas	26
3.5 Técnica de Imunohistoquímica	26
3.6 Análises das citocinas IL-4, IL-13 e TGF- β	27
3.7 Escore de Allred	28
3.8 Análise Estatística.....	29
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.0 CONCLUSÃO.....	35
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
7.0 REFERÊNCIAS	39
8.0 ANEXOS.....	44

1.0 INTRODUÇÃO

Em junho de 2009 o mundo se defrontava com a primeira pandemia do século XXI causada por um vírus respiratório, o influenza tipo A, subtipo (H1N1pdm09). Em fevereiro de 2010 o número de casos estimados pelo Centro de Controle e Prevenções de Doenças (CDC) era de cerca de 59 milhões, com aproximadamente 12 mil mortes nos Estados Unidos (1). Globalmente, a estimativa do número de óbitos pelo CDC em 2009-2010 variou de 151.700-575.400 (2). Onze anos após, o mundo se depara novamente com uma pandemia promovida por um vírus respiratório, o novo coronavírus intitulado de SARS-CoV-2 (Coronavírus-2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*), agente etiológico da doença denominada COVID-19 (Doença do Coronavirus 2019, do inglês *Coronavirus Disease 2019*) (3). O ano de 2021 inicia com a pandemia ativa, com um marco de 156.496.592 casos confirmados casos e mais de 3.200.000 óbitos até o fim da 18ª Semana do Calendário Epidemiológico do ano de 2021 (4).

Diferentemente do observado com o influenza A (H1N1pdm09), o crescimento do número de pacientes acometidos por SARS-CoV-2 se dá de forma exponencial desde o surto até a propagação mundial (5). A taxa de transmissibilidade (R_0) deste vírus é reflexo, principalmente, das suas características biológicas, bem como da suscetibilidade do hospedeiro (6). Esta taxa (R_0) varia de 1,6 a 4,1 (7), ou seja, cada paciente com o diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 poderia contaminar em média entre 1 e 4 pessoas, enquanto o R_0 do H1N1pdm09 girou em torno de 1,3 e 1,8, justificando a tamanha disseminação da atual pandemia (8).

O novo coronavírus é relatado como pertencente à família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus*. Possui esta denominação devido ao seu formato particular, semelhante ao de uma coroa com proteínas projetadas em seu envoltório. É composto por um capsídeo proteico que envolve o material genético, representado por uma molécula de RNA de fita simples sentido positivo (ssRNA), que está aliado a uma nucleoproteína na proteína da matriz (9). Além da presença de várias proteínas em sua superfície, a Proteína *Spike-S* (*Spike proteins*), uma espícula glicoproteica, possui uma alta afinidade com os receptores da enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2), os quais são expressos por quase todos

os tipos celulares do corpo humano, deixando seu hospedeiro muito vulnerável à infecção e ao desenvolvimento da doença (10).

No que tange ao SARS-CoV-2, a interação vírus-hospedeiro se inicia com a etapa de adsorção no ciclo de replicação viral (11). Aqui, há o envolvimento da ligação de alta afinidade entre a proteína S-*Spike* de sua estrutura com os receptores da ECA-2, formando um complexo pela interação entre a proteína viral e a ECA-2. Subsequentemente, o complexo é clivado pela protease adjacente, a serina protease transmembrana do tipo 2 (TMPRSS2), favorecendo a entrada do vírus na célula (12).

Embora haja uma relativa escassez de células portadoras de ECA-2 no trato respiratório superior, o SARS-CoV-2 infecta e se replica nas células epiteliais ali presentes (13). Este fenômeno, no entanto, não é observado em extensão significativa na infecção por SARS-CoV (14), o qual possui 79,5% de identidade de sequenciamento e que também utiliza a ECA-2 como porta de entrada para infectar seu hospedeiro (15). Além disso, a afinidade que o SARS-CoV-2 possui com este receptor parece ser substancialmente alta, entre 10 e 20 vezes maior que a exibida por SARS-CoV (12).

No ambiente pulmonar, o SARS-CoV-2 infecta preferencialmente os pneumócitos tipo II, dada a expressão aumentada de ECA-2 nesta célula em relação ao tipo I (11). A célula hospedeira endocita a partícula viral, a qual, ao se ligar a célula hospedeira, compete com a angiotensina II (Ang II) pela ligação ao ECA-2. Isto promove uma diminuição da atividade do receptor da Ang II, resultando em seu acúmulo (16). Um dos papéis da Ang II é a sinalização de eventos celulares e moleculares que são considerados críticos na patogênese da fibrose pulmonar. Nesse contexto, pode-se citar seu papel na proliferação, migração e diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos, os quais são capazes de sintetizar alfa-actina de músculo liso (α -SMA) e produzir matriz extracelular (colágeno e fibronectina), por meio de um mecanismo mediado pela secreção exacerbada de fator transformador de crescimento-beta (TGF- β) no próprio fibroblasto (17).

O vírus se replica e acaba por lesionar as células do epitélio pulmonar, proporcionando a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como as Interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), podendo ser assistida por uma resposta fraca da citocina sinalizadora de infecção por

patógenos intracelulares, os Interferons do tipo I (INF α e β) (18).

Durante uma resposta imune normal frente a uma infecção viral, macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos expressam uma variedade de receptores de reconhecimento padrões (PRRs), identificando estruturas diferentes, as quais são características do vírus invasor (19). Tais estruturas moleculares são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A ligação de PAMPs à PRRs desencadeia o início da resposta inflamatória contra o vírus invasor, resultando na ativação de um processo de sinalização que leva à expressão de fatores de transcrição indutores de citocinas pró-inflamatórias, como fator nuclear kappa B (NF- κ B), bem como na ativação de fatores reguladores de INF, que medeiam a resposta antiviral dependente desta última citocina.

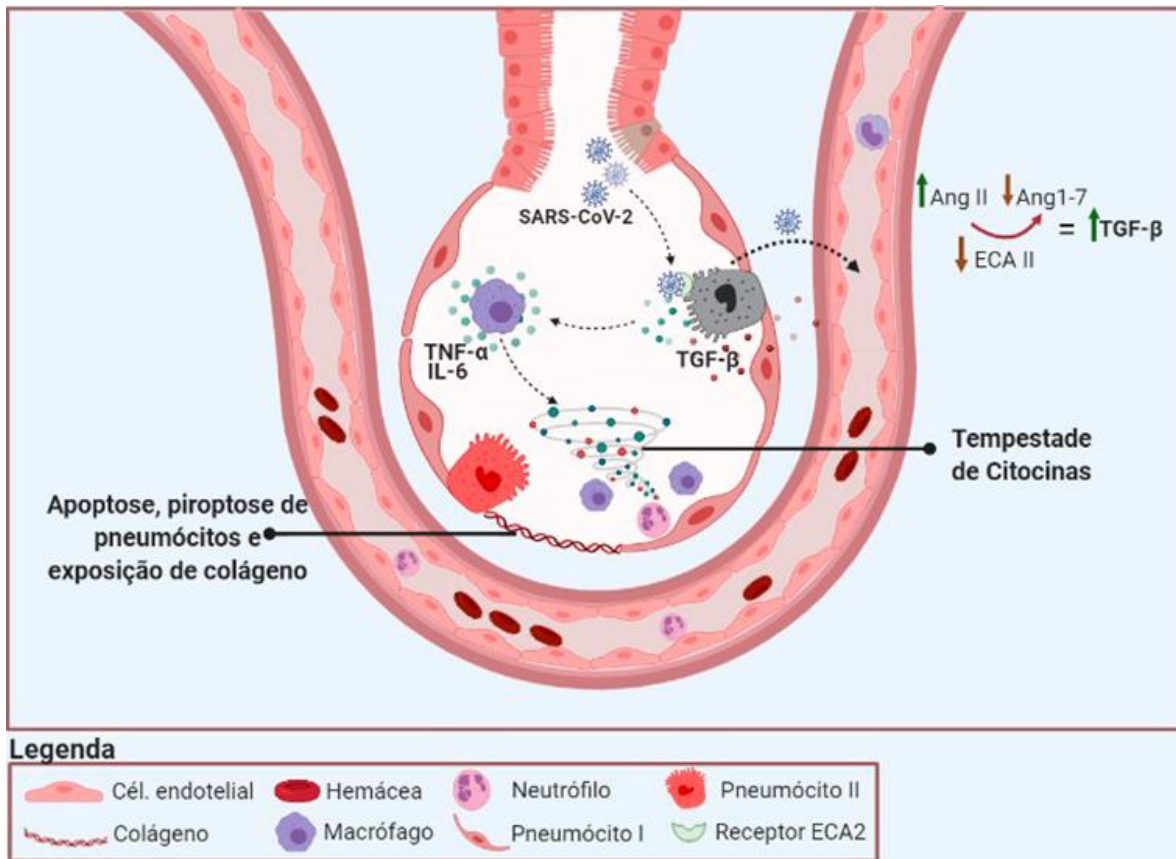
Todavia, a COVID-19 pode ser acompanhada de uma resposta inflamatória agressiva, em que se observa a liberação de uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias em um evento conhecido como "tempestade de citocinas", ou citocinememia. A resposta imune do hospedeiro frente ao vírus SARS-CoV-2 pode ser hiperativada, resultando em uma reação inflamatória exacerbada (20) (Figura 1).

A citocinememia resulta em um aumento agudo súbito nos níveis circulantes de diferentes citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6 e TNF- α , as quais são secretadas principalmente por macrófagos teciduais, mastócitos, células endoteliais e epiteliais. Este aumento de citocinas pode resultar no influxo de várias células imunológicas, como macrófagos, neutrófilos e células T no local da infecção, provocando efeitos destrutivos no tecido humano, dentre os quais a lesão pulmonar, com destaque na síndrome respiratória aguda grave (SRAG) (21).

A resposta imune inata à infecção de células epiteliais alveolares leva tanto à sua morte por apoptose ou piroptose, quanto à ativação de macrófagos alveolares. A piroptose consiste em uma forma alternativa de morte celular mediada principalmente pela enzima Caspase-1, e que tem como processo final a formação de poros em sua membrana (22). A ativação proteolítica da caspase-1 catalisa, subsequentemente, a maturação e secreção de citocinas pró-inflamatórias, especificamente Interleucina 1 beta (IL-1 β) e Interleucina 18 (IL-

18), exacerbando a citocinememia (23).

Figura 1. Infecção SARS-CoV-2, Tempestade de citocinas



Após a entrada do vírus na via aérea inferior, o SARS-CoV-2 passa a infectar principalmente os pneumócitos tipo II. Com a morte destas células, há liberação de citocinas inflamatórias e recrutamento leucocitário. Em decorrência de uma resposta inflamatória exacerbada, há liberação intensa de citocinas pró-inflamatórias, dando início a um evento denominado de tempestade de citocinas. Pela proximidade dos capilares alveolares adjacentes, o vírus passa a infectar as células endoteliais. Estas células, por sua vez, sofrem piroptose contribuindo também com a citocinememia. Desenho esquemático desenvolvido no Biorender pela autora, 2021.

Já, em relação à ativação dos macrófagos alveolares, tem-se que estes uma vez ativados tendem a se polarizar no fenótipo M1 inflamatório e secretam TNF- α e Interleucina 8 (IL-8), que são quimiotáticos para neutrófilos (12). No caso da lise celular em decorrência do final do seu ciclo lítico, partículas virais são liberadas ao ambiente alvéolo-capilar, promovendo, consequentemente, a passagem do SARS-CoV-2 para o interstício e vaso. Ao adentrar no vaso, o vírus passa a infectar as células endoteliais, induzindo-as também à piroptose (24).

As alterações mencionadas anteriormente estão intimamente associadas à ativação de células endoteliais vasculares, promovendo o recrutamento de células leucocitárias, além da síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais contribuem para a promoção de

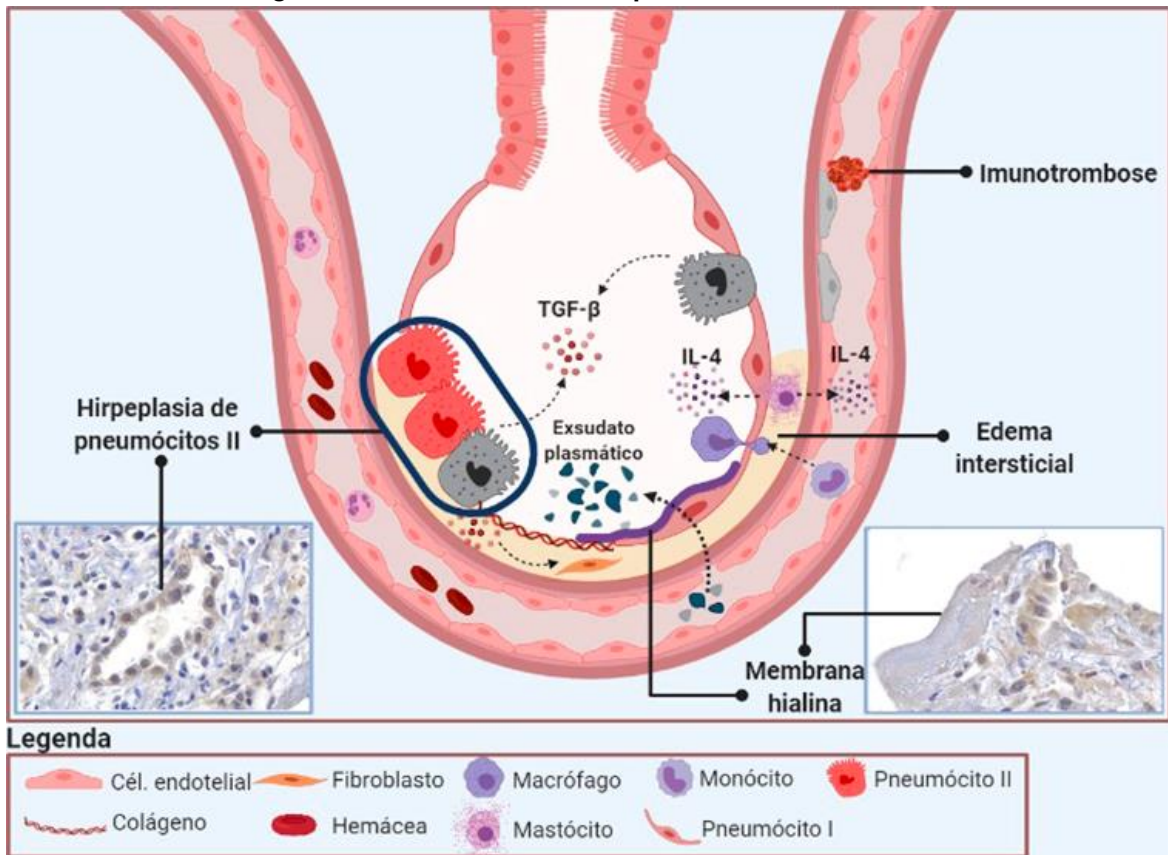
vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular e desenvolvimento de imunotrombose (12,22).

Uma vez aumentada a permeabilidade vascular, há exsudação do plasma circulante para o interstício e subsequentemente para a luz alveolar. Com a morte dos pneumócitos pela infecção viral, ocorre exposição de colágeno no assoalho alveolar. Moléculas do sistema complemento e da cascata de coagulação transudam para dentro dos alvéolos devido ao aumento da permeabilidade vascular, propiciando deposição de fibrina na parede alveolar desnuda, formando camadas espessas que impedem as trocas gasosas, conhecidas como membranas hialinas (25). Observa-se ainda a hiperplasia de pneumócitos tipo II no alvéolo, com o intuito de re-epitelizar as paredes alveolares e reconstituir a barreira alvéolo-capilar. Os quadros previamente relatados caracterizam o dano alveolar difuso que compõe a etapa exsudativa do processo cicatricial (15). O dano alveolar difuso é o aspecto histopatológico patognomônico da SRAG, observado na fase aguda da infecção, e se desenvolve nos primeiros quatro a sete dias após a contaminação (26–28) (Figura 2).

Os macrófagos de fenótipo M2 ativados alternativamente são induzidos pelas Interleucinas 4 e 13 (IL-4, IL-13), as quais são produzidas pelas células *T-helper* 2 (Th2) e outros leucócitos, como por exemplo, o mastócito (29). Os macrófagos são reconhecidos por exercerem uma ação anti-inflamatória, já que auxiliam na produção de citocinas anti-inflamatórias, como a Interleucina 10 (IL-10) e o antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra). Possuem uma potente capacidade fagocítica, removendo resíduos e células apoptóticas (eferocitose), além de desempenhar um papel fundamental de reparo do tecido pulmonar, limitando os níveis de citocinas pró-inflamatórias no espaço celular (30). Esses macrófagos, bem como as células Th2 próprias, induzem a formação de cicatrizes por meio de fibrose, através da secreção de fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e a angiogênese (29,31).

As citocinas que mais estimulam a via Th2 são a IL-4 e IL-13, pois interferem na resposta *T-helper* 1 (Th1), uma vez que suprimem a ativação dos macrófagos de fenótipo M1, conhecida como ativação clássica de macrófagos. A supressão dos macrófagos M1 ocorre, em parte, porque a IL-4 estimula a produção de citocinas, como o TGF- β , que inibem o desenvolvimento e função de resposta Th1 (29).

Figura 2. Mecanismo de lesão pulmonar na COVID-19



Com a chegada do vírus no vaso, ocorre a infecção e morte das células endoteliais, com desnudamento da lâmina basal e exposição do colágeno. Esta exposição contribui com o processo da cascata de coagulação intrínseca e subsequentemente com a formação de imunotrombose. Mastócitos presentes no interstício e região perivascular secretam mediadores, dentre os quais, a histamina e a IL-4 (sendo esta secretada tardiamente), atuando no aumento da permeabilidade vascular. Há o extravasamento do exsudato plasmático (moléculas do complemento, elementos da cascata de coagulação, fragmentos celulares, fibrina, entre outros) para o interstício pulmonar e luz alveolar, acarretando o desenvolvimento de membranas hialinas. Paralelamente, ocorre hiperplasia de pneumócitos tipo II. No canto inferior esquerdo, a imagem evidencia a imunoexpressão do anti-SARS-CoV-2 (ab 272504, Abcam, diluição 1:800) na membrana dos pneumócitos tipo II com hiperplasia. No canto inferior direito, a imagem demonstra a membrana hialina no lúmen alveolar. Desenho esquemático desenvolvido no Biorender pela autora, 2021.

A IL-4 é a principal citocina do subgrupo Th2 e funciona tanto como uma indutora quanto como uma citocina efetora dessas células. Funcionalmente, IL-4 induz a diferenciação de células T *naive* para um fenótipo Th2. Também regula a expressão plasmocitária de IgE, regulando a proliferação celular e a expressão de vários genes em diferentes tipos de células, como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais. Como mencionado anteriormente, a IL-4 conduz a ativação alternativa de macrófagos para fenótipo M2, além de promover a permeabilidade vascular e apoptose de células endoteliais (32).

Com relação às infecções virais que atingem o sistema respiratório, Bot e

col. (2000) observaram que a expressão de IL-4 durante a infecção por um vírus influenza teve efeitos negativos nas células T de memória CD8 (33). Já na pandemia causada pelo SARS-CoV-2, há estudos de pacientes com COVID-19 que detectaram níveis elevados de IL-4 como parte da tempestade de citocinas associada a sintomas respiratórios graves (34,35).

Em relação à IL-13, tem-se que muitas das ações observadas por esta citocina se sobrepõem às da IL-4, uma vez que ambas as interleucinas compartilham do mesmo receptor, o receptor alfa de interleucina 4 (IL-4R α) (29). No entanto, estudos mecanísticos detalhados conduzidos com inibidores de IL-4 e IL-13 em ratos sugerem que a via de sinalização da IL-13 provavelmente atue como o indutor dominante da fibrose dependente de Th2 em várias doenças pulmonares crônicas (36,37). Sugere-se também que esta interleucina possa ativar fibroblastos independente de TGF- β , os quais diferenciam-se em miofibroblastos liberando componentes de matriz extracelular (MEC) (38).

A persistência de macrófagos M2 nos locais da lesão é uma marca registrada do desenvolvimento de fibrose e a expressão estável de IL-4 e IL-13 promove a secreção de TGF- β (39). O TGF- β é uma citocina multifuncional que desempenha um papel fundamental no processo de reparo do tecido após uma lesão. Três isoformas de TGF- β são encontradas em mamíferos: TGF- β 1, 2 e 3, sendo que o TGF- β 1 está predominantemente envolvido na patogênese da doença pulmonar fibrótica (15).

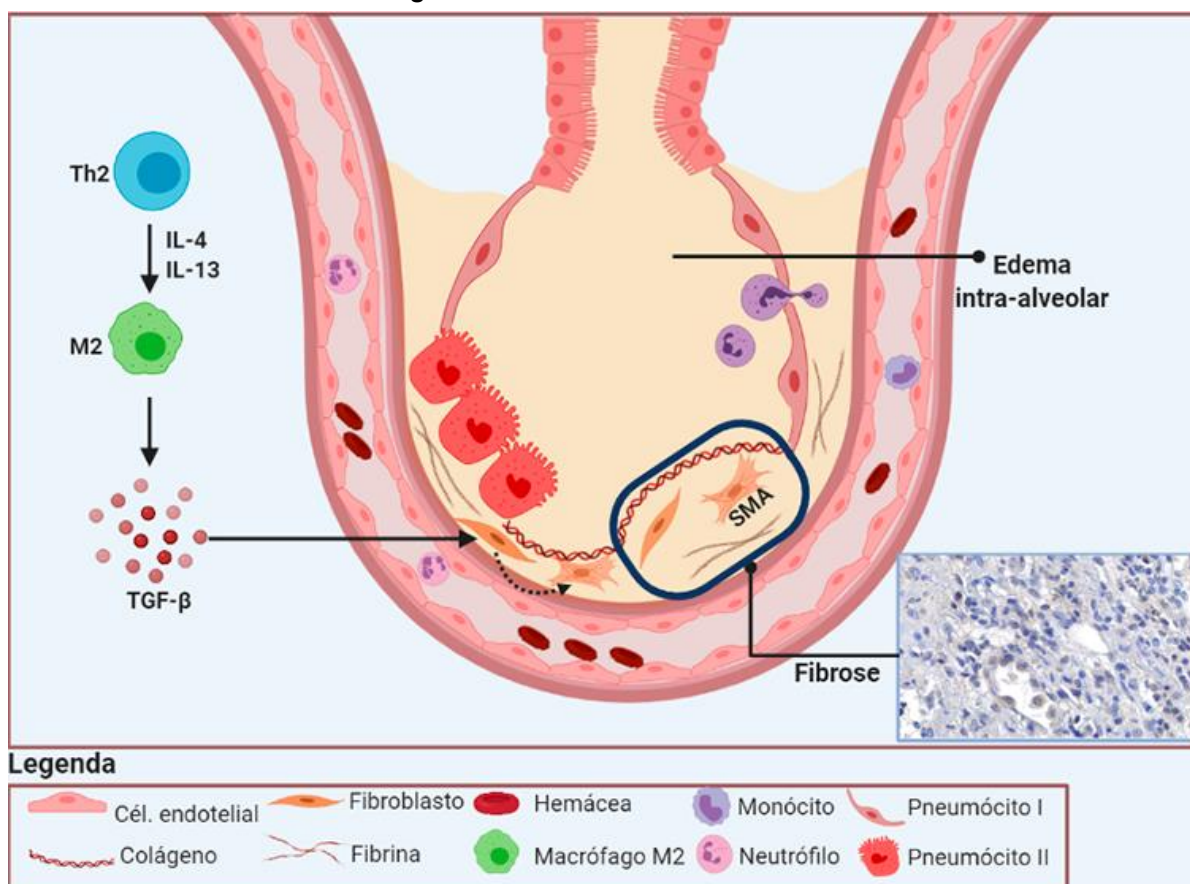
No contexto da lesão às células epiteliais pulmonares e da exposição da membrana basal do septo alveolar, há acúmulo de TGF- β , que induz o recrutamento de fibroblastos, que podem se diferenciar em miofibroblastos capazes de sintetizar SMA, que por sua vez promovem uma contração irreversível, característica importante da fibrogênese, além da produção de MEC (colágeno I e III principalmente e fibronectina) (11).

A proliferação excessiva de miofibroblastos e deposição de MEC interrompe a arquitetura normal dos alvéolos pulmonares. Acredita-se que um número maior de miofibroblastos atuem no reparo anormal e na remodelação pulmonar (40).

Na fibrose induzida por infecção viral pulmonar, o estresse oxidativo está evidente nas células epiteliais, estimulando também a produção e a liberação de TGF- β , causando migração, proliferação, ativação e diferenciação miofibroblástica de fibroblastos. O acúmulo anormal dessas células reflete no processo de

remodelação das vias aéreas. Além disso, a expressão de colágeno induzida por Ang II é dependente de TGF- β , que subsequentemente induz ao acúmulo de MEC (11). Nesse cenário, os fibroblastos ativados induzem mais lesões e morte das células epiteliais alveolares, criando desse modo um círculo vicioso de interações entre fibroblastos e células epiteliais pró-fibróticas nutridas por TGF- β , levando à formação de tecido cicatricial não funcional (Figura 3) (40).

Figura 3. Remodelamento tecidual



Com a persistência da resposta inflamatória, há o mecanismo de remodelamento tecidual, induzido pela ativação de macrófagos (M2). Este processo é resultante da ativação de linfócitos T CD4+ auxiliares que se diferenciam em subgrupos, dentre eles os linfócitos *T-helper* 2. Juntamente com a IL-4, a IL-13 induz a ativação alternativa de macrófagos M2 que leva à formação de fibrose por meio da secreção de fatores de crescimento, como o TGF- β , estimulando a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno. A imagem no canto inferior direito exemplifica a fibrose no ambiente alveolar do pulmão. Desenho esquemático desenvolvido no Biorender pela autora, 2021.

Estudos têm demonstrado uma relação tênue de pacientes acometidos por COVID-19 e fibrose pulmonar (11,15). O desenvolvimento e a progressão da SRAG e a organização e reparo tecidual terminal do dano alveolar difuso com remodelamento e fibrose parecem estar estreitamente relacionados à tempestade inflamatória de citocinas, bem como ao desequilíbrio do sistema renina-

angiotensina (SRA) (11,41). A destruição celular maciça provocada pelo SARS-COV-2 levaria a uma exacerbação de citocinas devido a ativação de macrófagos e um atraso no recrutamento de células linfocitárias, desencadeando uma resposta pobre em linfócitos (42). Com a persistência da agressão inflamatória, é desencadeada a fase proliferativa da resposta imunológica, que tem como objetivo restaurar a homeostase tecidual com remodelamento e fibrose (43).

Questões ainda não esclarecidas se referem à compreensão do comportamento da expressão de citocinas, que leva a COVID-19 de doença leve à letal como resultado de uma disfunção imunológica.

Com a persistência da resposta inflamatória, há o mecanismo de reparo tecidual, induzido pela ativação de macrófagos M2, resultante da ativação de linfócitos T CD4+ auxiliares que se diferenciam em subgrupos, dentre eles os linfócitos Th2. As funções das células Th2 são mediadas por IL-4, citocina esta que age como indutora e efetora dessas células. Juntamente com a IL-4, a IL-13 induz à ativação alternativa de macrófagos M2 que leva à formação de fibrose por meio da secreção de fatores de crescimento, como o TGF- β , estimulando a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno.

Por essa razão, o presente trabalho analisou seis casos de biópsias de pacientes que vieram a óbito por COVID-19, visando a compreensão do comportamento da via IL-4/IL-13/TGF- β , bem como dos macrófagos com fenótipo M2, associados ao processo de remodelamento tecidual pulmonar nas formas graves desta doença. Entender o mecanismo pressuposto que leva a doença da COVID-19 de leve à grave, como resultado de uma desregulação de citocinas e da disfunção imune, é um requisito fundamental para identificar um possível tratamento para pacientes em estado crítico que seja eficiente em minimizar a fibrose pulmonar terminal, a fim de propiciar menor morbidade aos pacientes recuperados.

2.0 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel das citocinas IL-4, IL-13, TGF- β e macrófagos com o fenótipo M2 (*Sphingosine-1*), presentes no processo de remodelamento tecidual, em amostras pulmonares de biópsias *post mortem* de pacientes que foram a óbito por COVID-19.

2.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar as amostras estudadas de acordo com o gênero e faixa etária;
- Avaliar a imunoexpressão tecidual das citocinas IL-4/IL-13/TGF- β em amostras pulmonares parafinadas dos pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Avaliar a quantidade de macrófagos com fenótipo M2 (*Sphingosine-1*) em amostras pulmonares parafinadas dos pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Comparar os resultados obtidos acima com amostras de pacientes que foram a óbito por influenza A, subtipo H1N1pdm09.
- Comparar os resultados obtidos acima com amostras de pacientes que foram a óbito por outras causas sem lesão pulmonar (Controle).

3.0 METODOLOGIA

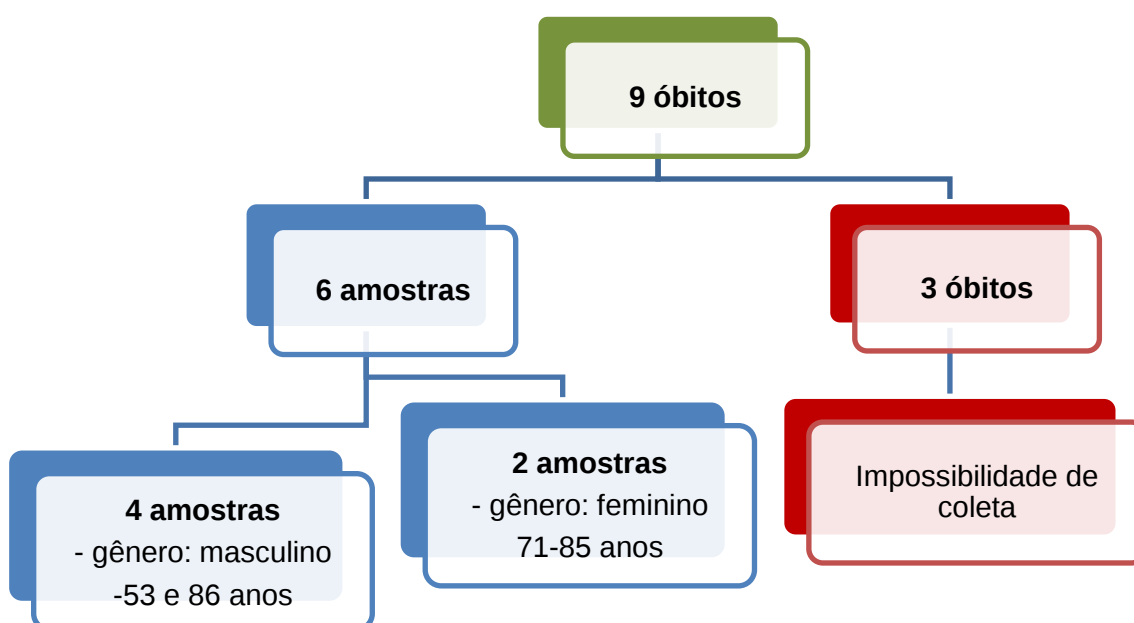
3.1 Grupo COVID-19

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) pelos números 3.944.734 / 2020 (Anexo 1). A metodologia foi realizada de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes. Os representantes legais dos pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.1.1 Amostras pulmonares do Grupo COVID-19

As amostras pulmonares *post mortem* são provenientes de pacientes que foram a óbito por COVID-19 (grupo COVID-19) durante a internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Marcelino Champagnat em Curitiba, Brasil, nos meses de março e abril de 2020, bem como os seus dados clínicos. Durante este período 9 pessoas morreram pela doença, 6 amostras foram coletadas, as quais foram utilizadas neste trabalho (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma das amostras de COVID-19.



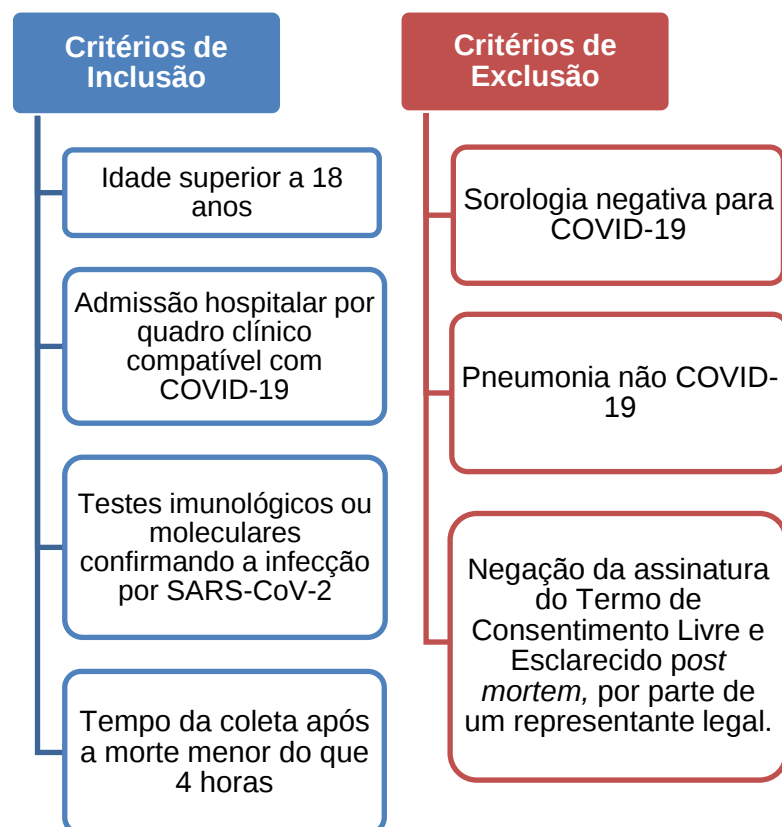
No período de março e abril de 2020, 9 pessoas foram a óbito por COVID-19 (em verde). Destes 9 óbitos foram coletadas 6 amostras, as quais foram utilizadas na presente pesquisa (em azul). Em vermelho, o número de óbitos em decorrência à COVID-19, porém não utilizadas por impossibilidade de coleta. Desenvolvido pela autora, 2021.

O teste para COVID-19 foi feito em *Swabs* nasofaríngeos adquiridos durante o período de internação, a fim de se realizar a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR). A amplificação do genoma viral foi efetuada com o kit Invitrogen SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR (número Catálogo: 11732020, Massachusetts, Estados Unidos), positivos para SARS-CoV2.

As amostras do referido grupo foram obtidas no leito da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) a partir de uma técnica de necropsia minimamente invasiva, ou seja, uma minitoracotomia anterior esquerda com ressecção de segmento do lobo superior esquerdo. As peças mediam aproximadamente 3x3 cm. Subsequentemente, estas peças foram acondicionadas em um frasco contendo formaldeído a 10% para posterior emblocagem em parafina, com a finalidade de se realizar colorações histológicas e ensaios de imunohistoquímica.

Critérios de inclusão e exclusão foram definidos a fim de se possibilitar o estabelecimento do perfil dos pacientes que adoeceram e foram a óbito por COVID-19 (Figura 5).

Figura 5. Fluxograma com critérios de inclusão e exclusão



Desenvolvido pela autora, 2021.

Dados demográficos, comorbidades existentes, medicamentos de uso contínuo, bem como exames laboratoriais e de imagens foram anotados e avaliados.

Também foram coletados dados clínicos e infecciosos durante o período de internamento em decorrência à infecção viral. O tempo de sobrevida foi definida como o período compreendido entre o internamento/diagnóstico e o óbito.

3.2 Grupo H1N1

A coleta de amostras foi realizada em acordo com Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, registro número 2.550.445/2018 (Anexo 2). A metodologia foi realizada de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes. Os representantes legais dos pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2.1 Amostras pulmonares do Grupo H1N1

O Grupo H1N1 é composto por amostras de pulmões de pacientes cuja causa de morte foi a infecção respiratória aguda grave causada pelo influenza A, subtipo H1N1pdm09 (n = 10). Os pacientes foram testados por meio da técnica de RT-qPCR (técnica similar à do grupo COVID-19), sendo possível a tipagem positiva para H1N1pdm09.

As amostras deste grupo foram obtidas a partir de uma técnica de necropsia minimamente invasiva, ou seja, uma minitoracotomia anterior esquerda com ressecção de segmento do lobo superior esquerdo. As peças mediam em torno de 3x3 cm. Estas peças foram acondicionadas em um frasco contendo formaldeído a 10% para posterior emblocagem em parafina.

Os fragmentos de pulmões acondicionados em blocos de parafina são provenientes do banco de amostras teciduais parafinadas de necropsias do Hospital das Clínicas (HC) de Curitiba.

Dados como gênero e idade dos pacientes foram obtidos por meio de uma pesquisa direta nos laudos de necropsias. O tempo de sobrevida foi definida como o período compreendido entre o internamento/diagnóstico e o óbito.

3.3 Grupo Controle

A coleta de amostras foi realizada em acordo com o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, registro número 2.550.445 / 2018. A metodologia foi realizada de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes. Os representantes legais dos pacientes assinaram o consentimento do exame de necropsia com termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para utilização de amostras em pesquisas científicas.

3.3.1 Amostras pulmonares do Grupo Controle

O grupo Controle (n = 11) é composto por amostras *post mortem* pulmonares provenientes de necropsias de pacientes que tiveram como causa de morte doença cardiovascular e neoplásica, não relacionados a lesões pulmonares. Os fragmentos de pulmões são provenientes do banco de amostras teciduais parafinadas de necropsias do Hospital das Clínicas (HC) de Curitiba. Estas peças foram acondicionadas em um frasco contendo formaldeído a 10% para posterior emblocagem em parafina.

Dados como gênero e idade dos pacientes foram obtidos por meio de uma pesquisa direta nos laudos de necropsias. O tempo de sobrevivência foi definida como o período compreendido entre o internamento/diagnóstico e o óbito.

3.4 Análises Histológicas

Os padrões anatomopatológicos encontrados nas amostras do presente estudo foram revisados em lâminas coradas em hematoxilina e eosina H&E (Harris Hematoxilina: NewProv, Cod. PA203, Paraná, BR; Eosina: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cod. 4371, Paraná, BR).

3.5 Técnica de Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada com a finalidade de identificar a imunoexpressão de IL-4, IL-13, TGF- β e *Sphingosine-1* (macrófagos M2) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados dos anticorpos utilizados.

Antibody	Type	Clone/Code	Dilution	Source	Species Reactivity	RRID
Anti-Sphingosine-1	Polyclonal/Rabbit	Ab71700	1:200	Abcam	Human, Rat, Mouse ¹	AB_1270891
Anti-IL-4	Polyclonal/Rabbit	PA5-25165	1:200	Thermo Fisher	Human, mouse ²	AB_2542665
Anti-IL-13	Polyclonal/Rabbit	P130-E	1:600	ThermoFisher	Human ³	AB_223471
Anti-TGF β	Polyclonal/Rabbit	E11262	1:200	Spring	Human ⁴	_*

¹<https://www.abcam.com/sphk1-antibody-ab71700.html>,

²<https://www.thermofisher.com/antibody/product/PA5-25165.html?CID=AFLAGPA525165>

³<https://www.thermofisher.com/antibody/product/P130E.html?CID=AFLAG-P130E>

⁴<http://www.imtec.be/files/images/Spring%20Bio%20catalogus%20-%20imtec.pdf>

* Não há um RRID uma vez que o fabricante (Spring) foi vendido para a empresa Abcam.

O ensaio de imunohistoquímica preconizou um protocolo de incubação dos anticorpos primários em câmara úmida, com temperatura entre 2 e 8° C, overnight. O polímero secundário (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, Pleasanton, CA) foi aplicado no material testado por 25 minutos em temperatura ambiente. A revelação da técnica se deu com a adição do complexo 2, 3, Diaminobenzidina + substrato peróxido de hidrogênio, por tempos suficientes para o desenvolvimento da cor castanha, seguida de contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Os resultados foram confirmados pela reatividade de um controle positivo, onde uma amostra tecidual com imunoexpressão sabidamente positiva para o anticorpo foi alocada juntamente com as amostras testadas.

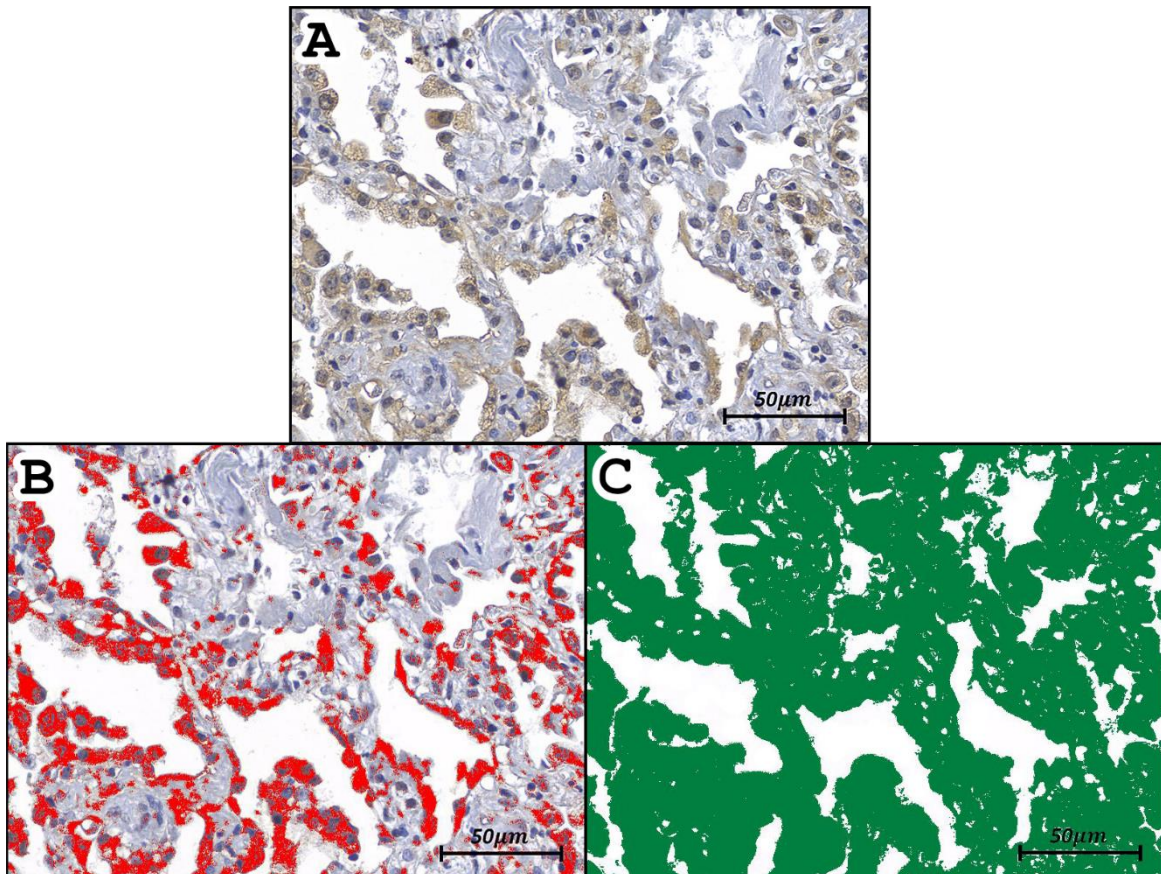
3.6 Análises das citocinas IL-4, IL-13 e TGF- β

As lâminas imunomarcadas com IL-4, IL-13 e TGF- β foram escaneadas com o auxílio do *Scanner* de lâminas Axio Scan.Z1 (Zeiss, Jena, Alemanha) e então submetidas a geração de dez campos de grande aumento (CGA = objetiva de 40X) pelo *software* ZEN Blue Edition (Zeiss, Jena, Alemanha). As análises foram realizadas de modo cego, sendo as imagens geradas, obtidas de regiões amostrais aleatórias, sem a interferência de um observador. A mensuração das áreas de imunoexpressão foi realizada com a assistência do *software* Image Pro-Plus versão 4.5 (Média Cybernetics, Rockville, MD).

De cada CGA, foi realizada a mensuração das áreas de imunoexpressão, com o emprego de um método de segmentação semiautomatizada por cores, na qual as áreas imunopositivas dos biomarcadores em questão foram artificialmente

delimitadas e quantificadas (Figura 6). Posteriormente, o valor expresso em micrômetros quadrados (μm^2) foi dividido pelo valor de sua respectiva área de tecido total e convertido em um valor percentual. Foram, então, calculados os valores de média aritmética dos dez CGA de cada paciente e os resultados obtidos foram planilhados no Excel para posterior análise estatística.

Figura 6. Análise morfométrica

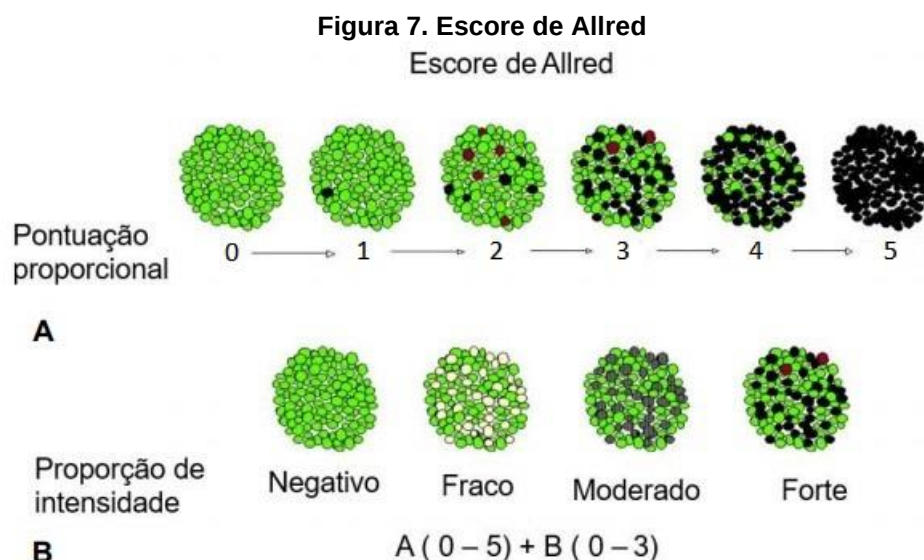


Composição de imagens demonstrando os processos da segmentação semiautomatizada por cores. **A:** Imagem de uma lâmina imunomarcada com anti-IL-4 digitalizada. **B:** Imagem da área imunopositiva delimitada com o auxílio do Programa Image Pro Plus. **C:** Imagem cuja área total foi delimitada artificialmente, com o intuito da quantificação do seu valor. Imagens de Seigo Nagashima, 2021.

3.7 Escore de Allred

As lâminas imunomarcadas por *Sphingosine-1* foram observadas em microscópio óptico BX50 (Olympus, Tóquio, Japão) e lidas em dez CGA onde os macrófagos M2 receberam um escore, por meio do método de pontuação conhecido como Escore de Allred. Este método avalia a proporção e a intensidade de positividade celular. A análise semiquantitativa foi obtida pela soma de dois

escores (proporção e intensidade de positividade), variando de 0 a 8. O escore da proporção foi subdividido de acordo com o percentual de imunoexpressão celular, em que pontuação celular poderia ser: pontuação 0: 0%; pontuação 1: <1%; pontuação 2: 1-10%; pontuação 3: 11-33%; pontuação 4: 34-66% e pontuação 5: > 66%. Já a intensidade da positividade foi avaliada em: negativa - pontuação 0; fraca - pontuação 1; moderada - pontuação 2 e forte - pontuação 3 (Figura 7).



Esquema ilustrativo representando a metodologia adaptada para o Escore de Allred. A cor verde indica as células negativas para imunoexpressão de determinado anticorpo, enquanto as cores, amarela, cinza, cinza escuro e preto identificam células coradas em diferentes intensidades. **A:** pontuação proporcional; 0: ausência de expressão da proteína analisada; 1: 1% das células com expressão positiva para a proteína analisada; 2: 1-10% das células com expressão positiva para a proteína analisada; 3: 11-33% das células com expressão positiva para a proteína analisada; 4: 34-66% das células com expressão positiva para a proteína analisada; 5: >66% das células com expressão positiva para a proteína analisada; **B:** proporção de intensidade; negativo: ausência de expressão da proteína; fraco: expressão fraca da proteína; moderado: expressão moderada da proteína; forte: expressão forte da proteína. Fonte: adaptado de Choudhury et al., 2010.

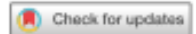
3.8 Análise Estatística

A comparação das variáveis quantitativas dos grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Para avaliação de grupos dois a dois foi utilizado o teste u de Mann-Whitney. Para as variáveis demográficas foi utilizado o teste t de student. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística nos testes mencionados acima. Os dados foram analisados com o auxílio do software IBM SPSS Statistics v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão do presente trabalho estão apresentados na revista Scientific Reports, indexada 2045-2322, Qualis A1, Scimago Q1, Fator de Impacto 3.998 (2019). O artigo se encontra disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41598-020-75659-5>



OPEN IL-4/IL-13 remodeling pathway of COVID-19 lung injury

Caroline Busatta Vaz de Paula^{1✉}, Marina Luise Viola de Azevedo², Seigo Nagashima¹, Ana Paula Camargo Martins², Mineia Alessandra Scaranello Malaquias¹, Anna Flavia Ribeiro dos Santos Miggiolaro¹, Jarbas da Silva Motta Júnior¹, Gibran Avelino³, Leticia Arianne Panini do Carmo⁴, Lucas Baena Carstens⁴ & Lucia de Noronha²

The COVID-19 fatality rate is high when compared to the H1N1pdm09 (pandemic Influenza A virus H1N1 subtype) rate, and although both cause an aggravated inflammatory response, the differences in the mechanisms of both pandemic pneumonias need clarification. Thus, our goal was to analyze tissue expression of interleukins 4, 13, (IL-4, IL-13), transforming growth factor-beta (TGF- β), and the number of M2 macrophages (Sphingosine-1) in patients who died by COVID-19, comparing with cases of severe pneumopathy caused by H1N1pdm09, and a control group without lung injury. Six lung biopsy samples of patients who died of SARS-CoV-2 (COVID-19 group) were used and compared with ten lung samples of adults who died from a severe infection of H1N1pdm09 (H1N1 group) and eleven samples of patients who died from different causes without lung injury (CONTROL group). The expression of IL-4, IL-13, TGF- β , and M2 macrophages score (Sphingosine-1) were identified through immunohistochemistry (IHC). Significantly higher IL-4 tissue expression and Sphingosine-1 in M2 macrophages were observed in the COVID-19 group compared to both the H1N1 and the CONTROL groups. A different mechanism of diffuse alveolar damage (DAD) in SARS-CoV-2 compared to H1N1pdm09 infections were observed. IL-4 expression and lung remodeling are phenomena observed in both SARS-CoV-2 and H1N1pdm09. However, SARS-CoV-2 seems to promote lung damage through different mechanisms, such as the scarce participation Th1/Th17 response and the higher participation of the Th2. Understanding and managing the aggravated and ineffective immune response elicited by SARS-CoV-2 merits further clarification to improve treatments propose.

In June 2009, the world was facing the first pandemic disease of the twenty-first century caused by a respiratory virus, the pandemic Influenza A virus H1N1 subtype (H1N1pdm09). In February 2010, the number of cases estimated by the Center for Disease Control and Prevention (CDC) was around 59 million, with approximately 12 thousand deaths¹. Eleven years later, the world is faced again with a pandemic disease called COVID-19 once more caused by another respiratory virus, the SARS-CoV-2 new coronavirus². Until June 15 of 2020, the fatality rate would be 5.4%³. In comparison, the mortality rate of H1N1pdm09 infection was less than 1%⁴.

Critical state COVID-19 patients require the use of mechanical ventilation⁵, and a study reported that about 9 to 11% of hospitalized patients, mainly elderly, required mechanical ventilation due to complications⁶. Severe conditions can lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS)⁷ with diffuse alveolar damage (DAD) characterized interstitial septal edema and hyaline membrane in the acute phase and the proliferation of fibroblasts and septal fibrosis in the chronic remodeling phase⁸.

The inflammatory cytokine storm described in COVID-19 appears to be closely related to the development and progression of ARDS. The massive cell destruction caused by SARS-CoV-2 would exacerbate cytokines releasing due to the activation of macrophages and a delay in the recruitment of TCD8⁺ lymphocytes, triggering an inadequate Th1 response^{9–11}.

The DAD fibrotic phase is understood as a repair mechanism induced by the activation of M2 macrophages triggered by Th2 response and TCD4⁺ lymphocytes. Th2 cell's functions are mediated by interleukin 4 (IL-4),

¹School of Medicine, Postgraduate Program of Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil. ²Laboratory of Experimental Pathology, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil. ³Hospital Marcelino Champagnat, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná-PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil. ⁴School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil. ✉email: carolbvaz@gmail.com

Antibody	Type	Clone/code	Dilution	Source	Species reactivity	RRID
Anti-Sphingosine-1	Polyclonal/Rabbit	Ab71700	1:200	Abcam	Human, Rat, Mouse ^a	AB_1270891
Anti-IL-4	Polyclonal/Rabbit	PA5-25165	1:200	Thermo Fisher Scientific	Human, Mouse ^b	AB_2542665
Anti-IL-13	Polyclonal/Rabbit	P130-E	1:600	Thermo Fisher Scientific	Human ^c	AB_223471
Anti-TGF- β	Polyclonal/Rabbit	E11262	1:200	Spring	Human ^d	— ^e

Table 1. Resource table. ^a<https://www.abcam.com/sphk1-antibody-ab71700.html>. ^b<https://www.thermofisher.com/antibody/product/PA5-25165.html?CID=AFLAGPA525165>. ^c<https://www.thermofisher.com/antibody/product/P130E.html?CID=AFLAG-P130E>. ^d<https://www.imtec.be/files/images/Spring%20Bio%20catalogues%20-%20imtec.pdf>. ^eThere is not a RRID once the manufacturer (Spring) were merged to another company (Abcam).

which activates interleukin-13 (IL-13). Both interleukins differentiate M2 macrophages with consequent fibrosis and release growth factors, such as the transforming growth factor-beta (TGF- β)^{4,12}.

In the absence of proven effective treatment for COVID-19, current therapy consists of supportive care. Besides, many patients have received off-label medications, including antiretrovirals, antiparasitic, anti-inflammatory drugs, and convalescent plasma¹³.

In this paper, post-mortem biopsies of COVID-19 patients were compared to patients who died of H1N1pdm09 and the control group to understand the role of IL-14, IL-13, TGF- β , and M2 macrophages recruitment in the cytokine storm and DAD pathogenesis in order to analyze the remodeling phase and its comorbidities.

Therefore, we sought to evaluate the histopathological and physiological differences between SARS-CoV-2 and H1N1pdm09, observing cytokine's expression to understand the mechanism leading to COVID-19 from mild to lethal disease as a result of immune dysfunction, thus being a requirement to identify possible treatments for critical disease.

Methods

Ethical approvals. The presented study was approved by the National Research Ethics Committee (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa—CONEP), protocol number 3.944.734/2020, and 2.550.445/2018. The authors confirm that all methods were carried out following relevant guidelines and regulations.

Families permitted the post-mortem biopsy of the cases of COVID-19, H1N1pdm09, and CONTROL groups; and signed the informed consent forms.

Samples were not obtained from prisoners, and the sample collection followed all relevant ethics and safety protocols.

Samples. Clinical data were obtained from medical records during hospitalization in the Intensive Care Unit (ICU) at the Hospital Marcelino Champagnat in Curitiba, Brazil (n = 6). Testing for COVID-19 was performed on nasopharyngeal swabs taken during ICU hospitalization, and the performed Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). The viral genome's amplification was performed with the Invitrogen SuperScriptTM III Platinum[®] One-Step qRT-PCR Kit (Catalog number: 11732020, Waltham, MA), were positive for SARS-CoV-2.

The pandemic H1N1 group consists of lung samples from patients whose cause of death was H1N1pdm09 severe acute respiratory infection (n = 10) during the 2009 pandemic. The patients were tested through the fresh samples of lung post-mortem biopsies, and the performed qRT-PCR (a similar technique to that of the COVID-19 group) was positive for H1N1pdm09.

The CONTROL group (n = 11) was composed of necropsy lung samples of patients who died due to cardiovascular and neoplastic disease, not involving lung lesions. The age of the CONTROL group ranged from 18 to 60 years, with mainly male patients, similarly to the pandemic H1N1 and COVID-19 groups.

A minimally invasive lung post-mortem biopsy was performed through a left anterior mini-thoracotomy with upper left lobe lingular segment resection. The resected pieces were 3 × 3 cm.

Histological and immunohistochemistry analysis. The lung samples provided by post-mortem biopsy were formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and stained with hematoxylin and eosin—H&E (Harris Hematoxylin: NewProv, Cod. PA203, Pinhais, BR; Eosin: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cod. 4371, Pinhais, BR). The immunohistochemistry technique was used to identify the expression of the IL-4, IL-13, TGF- β , and Sphingosine-1 for M2 macrophages scoring (Table 1).

The replication of the experiment does not apply to the immunohistochemistry technique. The result is confirmed by the positivity of positive control, a sample known to be positive for a specific antibody allocated together with the patient's samples (lung sample with respiratory syncytial virus (RSV) pneumonia, skin sample with dermatosis, and hyperplastic lymph node).

The IL-4, IL-13, and TGF-beta slides were scanned with Axio Scan.Z1 Scanner (ZEISS, Jena, Germany), and then ZEN Blue Edition (ZEISS, Jena, Germany) utilized to randomly generate the ten high-power fields (HPF = 40X objective). The analysis was blind once the images were randomly generated by the software, with no investigator's interference. The immunopositivity areas were measured by the Image-Pro Plus software version

Data	COVID-19 (N = 6)	H1N1 (N = 10)	Control (N = 11)
Gender	Male (4) 66.6%	Male (8) 80.0%	Male (8) 72.7%
	Female (2) 33.4%	Female (2) 20.0%	Female (3) 27.3%
	0.55*		0.79**
Age (years) ^a	76.5/80.5 (53–87)	43.5/44 (23–61)	42.3/45 (18–60)
	0.005*		0.003**
Time from hospitalization to death (days) ^a	12.8/10 (2–32)	4.70/1.5 (1–19)	–
Comorbidities (number of cases)	Hypertension (4/6) Dyslipidemia (1/6) Hypothyroidism (1/6) Class II obesity (2/6) Dementia (2/6) Diabetes mellitus (1/6) Chronic kidney disease (2/6) Coronary disease (2/6)	–	–
Mechanical ventilation ^a	9.7/8 (0–21)	4.70/1.5 (1–19)	–
Histological pattern of DAD	Interstitial pneumonitis with scarce septal neutrophils, hyaline membrane, with microthrombosis	Interstitial pneumonitis with high septal neutrophils infiltration, with no microthrombosis	Normal septum
Laboratory test 24 h before death (lymphocytes, mg/dl) ^a	1331.50/1045.50 (628.00–3514.00)	–	–
IL-4 tissue expression ^{a,b}	8.26/9.37 (0.71–13.39)	0.54/0.41 (0.19–1.12)	2.84/2.26 (0.23–7.41)
	0.003*		0.05**
IL-13 tissue expression ^{a,b}	0.39/0.28 (0.02–1.34)	2.05/1.60 (0.53–5.19)	0.13/0.02 (0.00–0.76)
	0.007*		0.07**
TGF- β tissue expression ^{a,b}	3.61/1.55 (0.14–13.53)	3.49/3.12 (0.47–8.88)	3.32/2.18 (0.46–9.92)
	0.51*		0.75**
Score of M2 macrophages (Sphingosine-1) ^{a,c}	2.33/2.00 (2.00–3.00)	3.10/3.00 (2.00–4.00)	1.18/1.00 (1.00–2.00)
	0.05*		0.001**

Table 2. Comparison between COVID-19, H1N1, and CONTROL groups according to clinical findings and pathology features. ^aAverage/median (Min–Max). ^bTissue expression in percentage per HPF. ^cAllred score in 10 HPF. DAD diffuse alveolar damage. **p*-values obtained were compared between COVID-19 versus H1N1. ***p*-values obtained were compared between COVID-19 and CONTROL group; *p*-values were performed using the non-parametric Mann–Whitney test (*p* < 0.05).

4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD). Subsequently, these areas were converted into percentages to enable statistical analysis.

The Sphingosine-1 slides were also used to highlight M2 macrophages in ten HPF. The images were chosen randomly from the septum and lumen alveolar, where the M2 macrophages were scored using the modified Allred score method. The semiquantitative analysis was obtained by summing two scores (proportion and intensity of positivity), ranging from 0 to 8. The proportion score is subdivided according to the percentage of stained cells: score 0—0% stained cells, score 1—< 1%, score 2—1–10%, score 3—11–33%, score 4—34–66% and score 5—> 66%. While the intensity of positivity is evaluated: negative—score 0, weak—score 1, moderate—score 2, and strong—score 3.

Statistical analysis. The comparison of the quantitative variables of the two groups was performed using the non-parametric Kruskal Wallis test. Values of *p* < 0.05 indicated statistical significance. The data were analyzed using the IBM SPSS Statistics v.20.0 software. Armonk, NY: IBM Corp.

Results

Clinical characteristics of the COVID-19 (*n* = 6), H1N1 (*n* = 10), and CONTROL (*n* = 11) groups as gender, age, time from hospitalization to death, comorbidities, histopathological patterns, and the tissue expression of IL-4, IL-13, TGF- β , and M2 macrophages score are listed in Table 2.

Tissue expression comparison of IL-4, IL-13, TGF- β , and the macrophages (Sphingosine-1) score of the COVID-19 and H1N1 groups are shown in Fig. 1 and Table 1. The COVID-19 group presents statistically significant higher tissue expression of IL-4 compared to H1N1 (*p* = 0.003) and CONTROL groups (*p* = 0.05, borderline). The H1N1 group presents a statistically significant higher tissue expression of IL-13 compared to COVID-19 (*p* = 0.007). No statistically significant differences between COVID-19 and CONTROL groups are shown (*p* = 0.07). The TGF- β tissue expression did not present statistical significance differences when all three groups were tested (*p* = 0.51 and *p* = 0.75, respectively). The M2 macrophages score was statistically significantly higher in the H1N1 group compared to the COVID-19 group (*p* = 0.05). When the COVID-19 group was compared to the CONTROL group, the former shows M2 macrophages score statistically significantly higher (*p* = 0.001).

Figure 2 demonstrates the lung tissue expression of IL-4, IL-13, and Sphingosine-1 (M2 macrophages) in all the COVID-19 and H1N1 patients. The IL-4 is consistently higher in COVID-19 patients when compared to

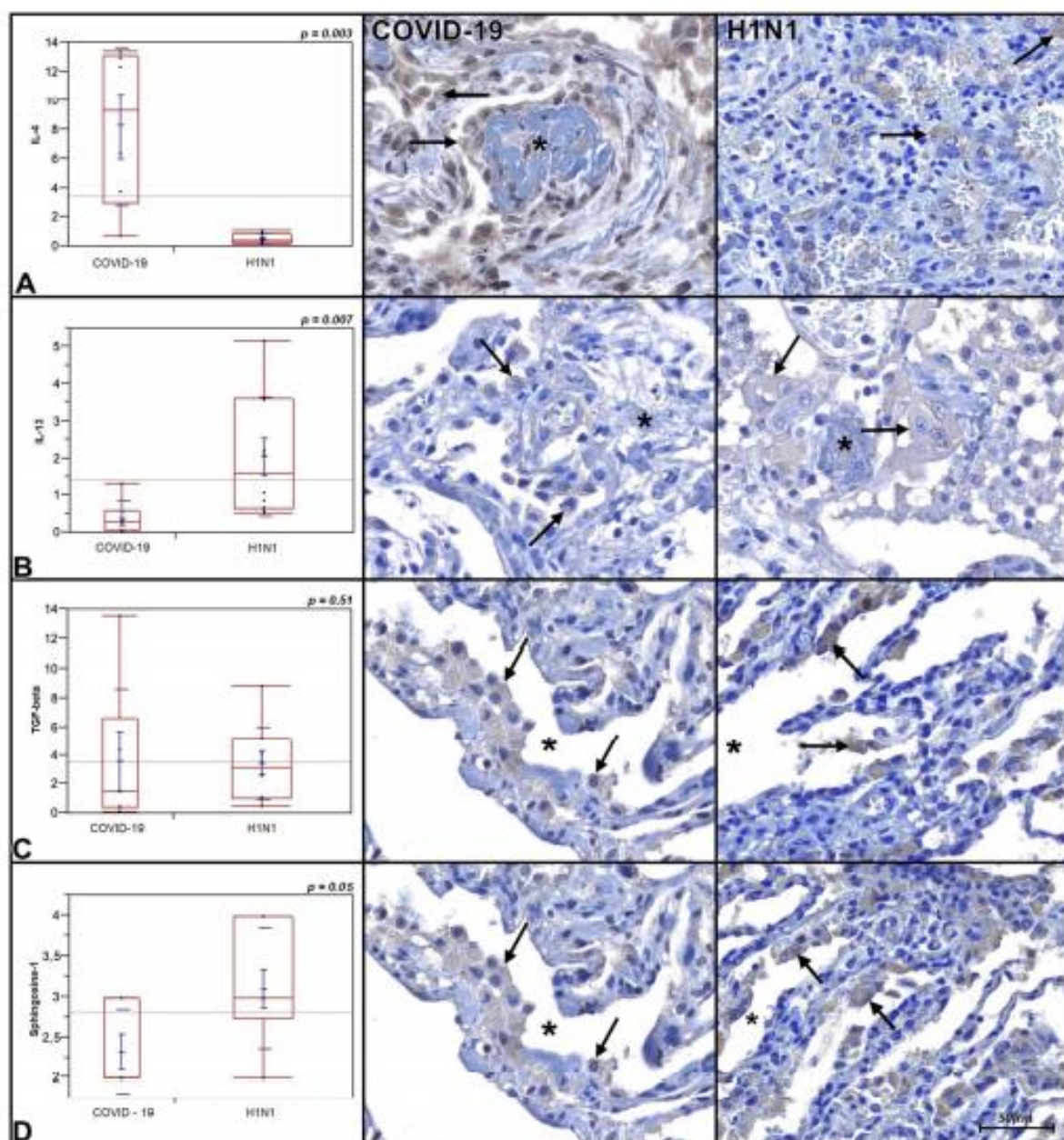


Figure 1. Graphics are showing tissue expression of IL-4, IL-13, TGF- β (percentage per HPF) and M2 macrophages Allred score of COVID-19 and H1N1 groups. Photomicrography is showing alveolar macrophages (arrows) expressing IL-4, IL-13, TGF- β , and Sphingosine-1 (M2 macrophages phenotype) in both groups. Asterisks are showing rests of hyaline membrane forming fibrin plugs (IL-4 and IL-13) and alveolar lumens (TGF- β and Sphingosine-1).

H1N1, even if considering different times from hospitalization to death. A contrary result was found for IL-13 and Sphingosine-1.

Discussion

Regarding the population analyzed, our findings support the literature that shows age as a risk factor and describes comorbidities associated with the severe form of COVID-19 and fatal outcomes^{14–16}. Although we have not found a statistical difference in gender distribution, male patients were prevalent (66.6%) in the COVID-19 group (as well as in the H1N1 group = 80%). The COVID-19 and H1N1pdm09 are different pandemic diseases concerning their demographic risk groups, pathophysiology mechanisms, and coinfection prevalence. Contrary to H1N1pdm09, COVID19 lethality is concentrated in older than 65 years of patients-following long periods of mechanical ventilation. Therefore, it is difficult to discard the influence of age, strength and duration of

been actively used since it combats coagulopathies, which are most likely caused by the immune system decompensation when facing COVID-19³⁷.

Since severe COVID-19 can lead to DAD, which has the potential of developing septal fibrosis, recovering patients may have an impairment of their lung functions, directly affecting their life quality. Considering that it is an irreversible condition, the use of monoclonal antibodies aimed at inhibiting Th2 cytokines could be used as a treatment for COVID-19.

Summarizing, although H1N1pdm09 activates the Th2 response, its pathogenesis seems to be strictly linked to the Th1/Th17 responses. In contrast, SARS-CoV-2 seems to promote lung damage through different mechanisms, such as the scarce participation Th1/Th17 response, and the higher participation of the Th2, when combined, might be inefficient for viral clearance. Thus, the understanding and management of the aggravated and ineffective immune response elicited by SARS-CoV-2 merit further clarification.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Received: 30 June 2020; Accepted: 14 October 2020

Published online: 29 October 2020

References

1. CDC Novel H1N1 Flu | CDC Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009–January 16, 2010. https://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates/April_March_13.htm.
2. Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N. & Siddique, R. COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J. Adv. Res.* **24**, 91–98 (2020).
3. Coronavirus Update (Live): 6,226,242 Cases and 372,744 Deaths from COVID-19 Virus Pandemic—Worldometer.
4. Mehta, P. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet (London, England)* **395**, 1033–1034 (2020).
5. Rokni, M., Ghasemi, V. & Tavakoli, Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS. *Rev. Med. Virol.* **30**, e2107 (2020).
6. Remuzzi, A. & Remuzzi, G. COVID-19 and Italy: what next? *Lancet* **395**, 1225–1228 (2020).
7. Zhang, T., Sun, L. X. & Feng, R. E. Comparison of clinical and pathological features between severe acute respiratory syndrome and coronavirus disease 2019. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* **43**, E040 (2020).
8. Barton, L. M., Duval, E. J., Stroberg, E., Ghosh, S. & Mukhopadhyay, S. COVID-19 autopsies, Oklahoma, USA. *AJCP Orig. Artic. Am. J. Clin. Pathol.* **20**, 1–9 (2020).
9. Ye, Q., Wang, B. & Mao, J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19. *J. Infect.* **80**, 607–613 (2020).
10. Jin, Y. et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses* **12**, 372 (2020).
11. Han, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1123–1130 (2020).
12. Thompson, B. T., Chambers, R. C. & Liu, K. D. Acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **377**, 562–572 (2017).
13. Yuki, K., Fujioji, M. & Koutsogiannaki, S. COVID-19 pathophysiology: a review. *Clin. Immunol.* **215**, 108427 (2020).
14. Meftahi, G. H., Jangravi, Z., Sahraei, H. & Bahari, Z. The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: the contribution of ‘inflamm-aging’. *Inflamm. Res.* **69**, 825–839 (2020).
15. Bonafè, M. et al. Inflamm-aging: why older men are the most susceptible to SARS-CoV-2 complicated outcomes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **53**, 33–37 (2020).
16. Cunha, L. L., Perazzo, S. F., Azzi, J., Cravedi, P. & Riella, L. V. Remodeling of the immune response with aging: immunosenescence and its potential impact on COVID-19 immune response. *Front. Immunol.* **11**, 1748 (2020).
17. Sarzi-Puttini, P. et al. COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome?. *Clin. Exp. Rheumatol.* **38**, 337–342 (2020).
18. Diao, B. et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* **11**, 827 (2020).
19. Wang, F., Xia, H. & Yao, S. Regulatory T cells are a double-edged sword in pulmonary fibrosis. *Int. Immunopharmacol.* **84**, 106443 (2020).
20. Passalacqua, G. et al. IL-13 and idiopathic pulmonary fibrosis: possible links and new therapeutic strategies. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **45**, 95–100 (2017).
21. Song, J. et al. Distinct effects of asthma and COPD comorbidity on disease expression and outcome in patients with COVID-19. *Allergy* <https://doi.org/10.1111/all.14517> (2020).
22. Du, H. et al. Clinical characteristics of 182 pediatric COVID-19 patients with different severities and allergic status. *Allergy* <https://doi.org/10.1111/all.14452> (2020).
23. McLeod, J. J. A., Baker, B. & Ryan, J. J. Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. *Cytokine* **75**, 57–61 (2015).
24. da Motta Junior, J. S. et al. Mast cells in alveolar septa of COVID-19 patients: a pathogenic pathway that may link interstitial edema to immunothrombosis. *Front. Immunol.* **11**, 574862 (2020).
25. Patrino, C., Stingeni, L., Fabbrocini, G., Hansel, K. & Napolitano, M. Dupilumab and COVID-19: what should we expect?. *Dermatol. Ther.* <https://doi.org/10.1111/dth.13502> (2020).
26. Prompetchara, E., Ketloy, C. & Palaga, T. Allergy and Immunology Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* <https://doi.org/10.12932/AP-200220-0772> (2020).
27. Akbari, H. et al. The role of cytokine profile and lymphocyte subsets in the severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *Life Sci.* **258**, 118167 (2020).
28. Lin, L. et al. Long-term infection of SARS-CoV-2 changed the body's immune status. *Clin. Immunol.* **218**, 108524 (2020).
29. Wong, C. K., Cao, J., Yin, Y. B. & Lam, C. W. K. Interleukin-17A activation on bronchial epithelium and basophils: a novel inflammatory mechanism. *Eur. Respir. J.* **35**, 883–893 (2010).
30. Arriaga-Pizano, L. et al. Differential immune profiles in two pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus waves at pandemic epicenter. *Arch. Med. Res.* **46**, 651–658 (2015).
31. Martinez-Ocaña, J. et al. Plasma cytokine levels and cytokine gene polymorphisms in Mexican patients during the influenza pandemic A(H1N1)pdm09. *J. Clin. Virol.* **58**, 108–113 (2013).
32. Zhao, Y. et al. High levels of virus-specific CD4⁺ T cells predict severe pandemic influenza A virus infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 1292–1297 (2012).
33. Altheheel, A. et al. Assessment of Th1/Th2 cytokines among patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Int. Immunol.* <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa047> (2020).

34. Ackermann, M. *et al.* Morphomolecular motifs of pulmonary neoangiogenesis in interstitial lung diseases. *Eur. Respir. J.* **55**, 1900933 (2020).
35. Kalil, A. C. Treating COVID-19—off-label drug use, compassionate use, and randomized clinical trials during pandemics. *JAMA* **323**, 1897–1898 (2020).
36. Grein, J. *et al.* Compassionate use of remdesivir for patients with severe COVID-19. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/nejmoa2007016> (2020).
37. Menezes-Rodrigues, F. S. *et al.* Anticoagulant and antiarrhythmic effects of heparin in the treatment of COVID-19 patients. *J. Thromb. Haemost.* <https://doi.org/10.1111/jth.14902> (2020).

Author contributions

Study design: C.B.V.P., L.N. Data collection: C.B.V.P., L.N., S.N., G.A., A.F.R.M., J.S.M.J. Data analysis: C.B.V.P., M.L.V.A., S.N., A.N.C.M., M.A.S.M., L.B.C., L.N. Data interpretation: C.B.V.P., M.L.V.A., S.N., A.N.C.M., M.A.S.M., A.F.R.M., J.S.M.J., L.B.C., L.A.P.C. Manuscript writing: C.B.V.P., M.L.V.A., S.N., L.B.C., L.N.

Funding

LN is a researcher from CNPq (304356/2018-2).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.B.V.d.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

5.0 CONCLUSÃO

No que diz respeito à caracterização demográfica das amostras estudadas, observa-se que, embora não haja significância estatística, indivíduos do sexo masculino foram mais acometidos pela COVID-19 e Influenza A (H1N1pdm09). A faixa etária do Grupo COVID-19 se demonstrou maior em relação aos demais grupos, sendo que a idade avançada é um fator de risco para as formas graves da COVID-19.

No que se concerne à imunoexpressão da IL-4, tem-se que este biomarcador apresentou resultado significativamente maior no Grupo COVID-19 em relação aos outros grupos testados, sendo aproximadamente 15 vezes maior em relação ao Grupo H1N1 e praticamente 3 vezes maior que no Grupo Controle.

Não foi observada diferença estatística da IL-13 no Grupo COVID-19 quando comparado ao Grupo Controle, porém notou-se que este biomarcador foi significativamente maior no Grupo H1N1 em relação ao Grupo COVID-19.

A imunoexpressão tecidual de TGF- β não apresentou diferenças estatísticas ao se testar os três grupos.

Ao se avaliar o escore dos macrófagos com fenótipo M2 (*Sphingosine-1*), verificou-se escores significativamente maiores no Grupo COVID-19 se comparados ao Grupo Controle. Além disso, o Grupo H1N1 apresentou escores significativamente maiores que o Grupo COVID-19.

Os achados do presente estudo pressupõem que a via Th2 esteja ativada, uma vez que se denota um aumento da quantidade de macrófagos com fenótipo M2. Estas células são ativadas por intermédio de IL-4, a qual está amplamente estimulada no Grupo COVID-19.

Embora a imunoexpressão de TGF- β não esteja significativamente aumentada, a existência de fibrose imatura em pacientes pertencentes ao Grupo COVID-19, com intensa proliferação de fibroblastos, prediz que este fator de crescimento esteja participando ativamente do processo de remodelamento tecidual.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pandemia de SARS-CoV-2 é única, tendo em vista algumas peculiaridades do vírus que vão desde a alta afinidade da proteína S com os receptores ECA-2, amplamente expressos nas células do corpo humano, à sua alta transmissibilidade e à susceptibilidade dos hospedeiros, além da intensidade excepcional da resposta imune frente à infecção.

Nesse sentido, este estudo se concentrou em avaliar a resposta Th2 e as citocinas envolvidas nesta via, frente às infecções virais do trato respiratório causadas pelo SARS-CoV-2.

Dada a urgência de entendimento da resposta imune frente a esse vírus e a complexidade em se obter amostras, o presente trabalho foi composto por 6 amostras pulmonares *post mortem* de pacientes que foram a óbito por COVID-19, sendo esta caracterizada como a maior limitação deste estudo.

Diferentemente dos pacientes acometidos por influenza (H1N1pdm09), esta doença parece ter uma resposta Th2 mais evidenciada, a qual é ineficiente no que diz respeito à promoção do *clearance* dos agentes virais. Desse modo, o entendimento da resposta imune exacerbada e ineficaz provocada por SARS-CoV-2 merece esclarecimentos adicionais.

Sendo assim, propõem-se, na continuidade deste projeto, avaliar biomarcadores envolvidos no processo de remodelamento tecidual e reposta Th2, em 24 amostras pulmonares *post mortem* de pacientes que foram a óbito por COVID-19. De uma forma abrangente, pretende-se estudar além dos marcadores biológicos já contidos nesta pesquisa, as seguintes proteínas:

- **α -SMA:** microfilamento presente no citoplasma das células musculares lisas, sendo parte integrante do seu sistema contrátil. A α -SMA é amplamente expressa por miofibroblastos, células estas responsáveis pelas principais características da fibrose ativa. Sugere-se que a expressão da α -SMA esteja relacionada à inibição do Fator de Crescimento do Tecido Conectivo (CTGF), ao qual está associada com a reduzida translocação nuclear NF- κ B (44). Miofibroblastos expressando α -SMA não só promovem a contração, mas também sintetizam níveis elevados de proteases degradantes da matriz extracelular (45). Estas manifestações estão relacionadas diretamente na indução e progressão da fibrose.

- **Colágenos I e III:** a intensa ativação e proliferação de fibroblastos leva à fibrose acentuada, que tem como ponto de partida a luz dos alvéolos e se processa com grande velocidade. Um pulmão com dano alveolar difuso na fase proliferativa é capaz de acumular, em poucos dias, tanto colágeno quanto o encontrado em uma fibrose intersticial crônica (25). O acúmulo de colágeno intersticial, principalmente dos tipos I, III e IV, é responsável pela destruição da arquitetura pulmonar e consequente falha na troca gasosa (46).

- **Metaloproteinase de Matriz - 9 (MMP-9):** entre os mediadores excessivamente produzidos no processo de remodelamento tecidual, as metaloproteinases de matriz (MMPs) podem contribuir para modificar o microambiente pulmonar por diversos mecanismos. Essas enzimas podem não apenas degradar os componentes da matriz extracelular, mas também são capazes de liberar, clivar e ativar uma ampla gama de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e receptores de superfície celular que afetam várias funções celulares, incluindo adesão, proliferação, diferenciação, recrutamento e apoptose. A expressão desregulada de MMPs pode ter um grande impacto nos mecanismos biopatológicos implicados no desenvolvimento da fibrose pulmonar (47). A MMP-9 é uma gelatinase expressa por células epiteliais alveolares, neutrófilos, macrófagos, fibroblasto, capaz de ativar o TGF- β 1, contribuindo com o aumento do pool de TGF- β ativo (48).

- **Ciclo-oxigenase 2 (COX-2):** o epitélio alveolar injuriado não apenas promove sinais ativadores para células mesenquimais, como também deixam de exercer sua função supressora sobre a multiplicação de fibroblastos, via produção de prostaglandinas E2 (PGE2) e derivados da ciclo-oxigenase COX-1 e principalmente COX-2, importante na produção dessa prostaglandina. Sugere-se que, níveis reduzidos de PGE2 por injúria epitelial possam aumentar a proliferação, migração, contratibilidade e diferenciação dos fibroblastos para miofibroblastos, intensificando o processo fibrótico (49). Sugere-se que a COX-2 possua uma ação anti-fibrótica, via elaboração de prostanóides, previamente conhecidos por sua capacidade de inibirem a produção de colágeno, bem como a proliferação de fibroblastos (50).

- **Caveolina 1 (Cav-1):** proteína envolvida na regulação da sinalização de TGF- β , por meio de uma interação física com receptores de membrana TGF- β e participação da internalização desses receptores. Os

receptores de TGF- β internalizados sofrem degradação rápida, levando a uma redução efetiva da sinalização desse fator de crescimento. Estas interações demonstram a correlação negativa entre a expressão de Cav-1 e a atividade de TGF- β observada na fibrose pulmonar (51). A deficiência de caveolina-1 está associada com o desenvolvimento de lesões fibróticas no pulmão, enquanto a sua expressão determina alguma proteção contra fibrose (52).

- **CD44v6:** é um receptor de adesão celular que é regulado positivamente após a lesão tecidual e que está implicada em muitas doenças inflamatórias crônicas. O CD44 é o principal receptor do ácido hialurônico ou hialuronan (HA). O HA apresenta funções que podem influenciar na morfologia das fibras de colágeno. Sua interação com proteínas da matriz extracelular e com receptores da superfície celular podem regular muitos aspectos do comportamento das células, que vão desde migração, adesão célula-célula e diferenciação celular. Em doenças fibrosantes pulmonares o HA pode aumentar a vida dos miofibroblastos e, por conseguinte perpetuar o contínuo depósito de fibras de colágeno na matriz extracelular (53). Estudos recentes, sugerem que o HA possa ser um potencial responsável por casos fatais da COVID-19, uma vez que a sua presença está associada à inflamação e a SDRA(54,55).

7.0 REFERÊNCIAS

1. CDC Novel H1N1 Flu |CDC Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009 – January 16, 2010 [Internet]. [cited 2020 Sep 7]. Available from: https://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates/April_March_13.htm
2. Abdelrahman Z, Li M, Wang X. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
3. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. Vol. 24, *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V.; 2020. p. 91–8.
4. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [Internet]. [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://covid19.who.int/>
5. Huang X, Wei F, Hu L, Wen L, Chen K. Epidemiology and Clinical Characteristics of COVID-19. *Arch Iran Med*. 2020 Apr;23(4):268–71.
6. Lana RM, Coelho FC, Gomes MF da C, Cruz OG, Bastos LS, Villela DAM, et al. The novel coronavirus (SARS-CoV-2) emergency and the role of timely and effective national health surveillance. *Cad Saude Publica*. 2020;36(3):e00019620.
7. Read J, Bridgen J, Cummings D, Ho A, Jewell C. Novel coronavirus 2019-nCoV: early estimation of epidemiological parameters and epidemic predictions. *medRxiv*. 2020 Jan;2020.01.23.20018549.
8. Situação da Gripe [Internet]. [cited 2020 Jun 17]. Available from: <http://info.gripe.fiocruz.br/>
9. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(11):1061–9.
10. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus (Covid-19) outbreak. *J Autoimmun*. 2020;109(January):1–4.
11. Bottasso O, Delpino MV, Quarleri J. SARS-CoV-2 Pathogenesis: Imbalance in the Renin-Angiotensin System Favors Lung Fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol* | www.frontiersin.org [Internet]. 2020;1:340. Available from: www.frontiersin.org
12. Morris G, Bortolasci CC, Puri BK, Olive L, Marx W, O'Neil A, et al. The pathophysiology of SARS-CoV-2: A suggested model and therapeutic approach. Vol. 258,

Life Sciences. Elsevier Inc.; 2020. p. 118166.

13. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med*. 2020;26(5):681–7.

14. Mason RJ, Health J. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. [cited 2021 Jan 3]; Available from: <https://doi.org/10.1183/13993003.00607-2020>].

15. Ojo AS, Balogun SA, Williams OT, Ojo OS. Pulmonary Fibrosis in COVID-19 Survivors: Predictive Factors and Risk Reduction Strategies. *Pulmonary Medicine*. 2020.

16. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review [Internet]. Vol. 215, *Clinical Immunology*. Academic Press Inc.; 2020 [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32325252/>

17. Jia H. Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and Inflammatory Lung Disease. *Shock* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Jan 4];46(3):239–48. Available from: <https://journals.lww.com/00024382-201609000-00003>

18. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brüggen MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2020;75(7):1564–81.

19. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol* [Internet]. 2020;2:0–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26232>

20. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jun 16 [cited 2021 Jan 5];11:1446. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01446/full>

21. Cron RQ, Behrens EM. Cytokine Storm.

22. Nagashima S, Mendes MC, Camargo Martins AP, Borges NH, Godoy TM, Miggiolaro AFRDS, et al. Endothelial dysfunction and thrombosis in patients with COVID-19 - Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;(October):2404–7.

23. Yap JKY, Moriyama M, Iwasaki A. Inflammasomes and Pyroptosis as Therapeutic Targets for COVID-19. *J Immunol* [Internet]. 2020 Jul 15 [cited 2021 Apr 14];205(2):307–12. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/205/2/307>

24. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(2):99–109.

25. & Wolfman LSBA. *Patologia Bogliolio*. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013. 1689–1699 p.

26. Ribeiro dos Santos Miggiolaro AF, da Silva Motta Junior J, Busatta Vaz de Paula C,

Nagashima S, Alessandra Scaranello Malaquias M, Baena Carstens L, et al. Covid-19 cytokine storm in pulmonary tissue: Anatomopathological and immunohistochemical findings. *Respir Med Case Reports*. 2020;31.

27. Barton LM, Duval EJ, Stroberg E, Ghosh S, Mukhopadhyay S. COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. *AJCP / Orig Artic Am J Clin Pathol*. 2020;XX:1–9.

28. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute respiratory distress syndrome. Drazen JM, editor. Vol. 377, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2017. p. 562–72.

29. Abbul K. Abbas, Andrew H. Lichtman SP. *Imunologia celular e molecular* [Internet]. 8ed ed. Rio de Janeiro; 2012. Available from: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>

30. Du H, Dong X, Zhang J, Cao Y, Akdis M, Huang P, et al. Clinical characteristics of 182 pediatric COVID-19 patients with different severities and allergic status. *Allergy*. 2020 Sep;all.14452.

31. Lin L, Luo S, Qin R, Yang M, Wang X, Yang Q, et al. Long-term infection of SARS-CoV-2 changed the body's immune status. *Clin Immunol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2020 Sep 19];218. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32659373/>

32. Skaria T, Burgener J, Bachli E, Schoedon G. IL-4 causes hyperpermeability of vascular endothelial cells through Wnt5A signaling. *PLoS One*. 2016;11(5):1–22.

33. Bot A, Holz A, Christen U, Wolfe T, Temann A, Flavell R, et al. Local IL-4 expression in the lung reduces pulmonary influenza-virus- specific secondary cytotoxic T cell responses. *Virology*. 2000;269(1):66–77.

34. Chen C, Zhang XR, Ju ZY, He WF. [Advances in the research of mechanism and related immunotherapy on the cytokine storm induced by coronavirus disease 2019]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 11];36(6):471–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32114747/>

35. Costela-ruiz VJ, Illescas-montes R, Puerta-puerta JM, Ruiz C, Melguizo-rodríguez L. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).

36. Keane MP, Gomperts BN, Weigt S, Xue YY, Burdick MD, Nakamura H, et al. IL-13 Is Pivotal in the Fibro-Obliterative Process of Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *J Immunol* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2021 Jan 11];178(1):511–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17182591/>

37. Ramalingam TR, Pesce JT, Sheikh F, Cheever AW, Mentink-Kane MM, Wilson MS, et al. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor $\alpha 1$ chain. *Nat Immunol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2021 Jan 11];9(1):25–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18066066/>
38. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 2011;208(7):1339–50.
39. Huang X, Xiu H, Zhang S, Zhang G. The role of macrophages in the pathogenesis of al/ARDS. *Mediators Inflamm*. 2018;2018.
40. Zhu L, Fu X, Chen X, Han X, Dong P. M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway. *Cell Biol Int* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Jan 11];41(9):960–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28493530/>
41. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19.’ Vol. 80, *Journal of Infection*. W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 607–13.
42. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*. 2020 Mar;12(4):372.
43. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* (London, England). 2020 Mar;0(0).
44. Petrov V V, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of Collagen Production by Transforming Growth Factor-1 During Differentiation of Cardiac Fibroblasts to Myofibroblasts [Internet]. 2002. Available from: <http://www.hypertensionaha.org>
45. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. Vol. 14, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2003. p. 538–46.
46. Zhang K, Gharaee-Kermani M, McGarry B, Phan SH. In situ hybridization analysis of rat lung $\alpha 1(I)$ and $\alpha 2(I)$ collagen gene expression in pulmonary fibrosis induced by endotracheal bleomycin injection. *Lab Invest* [Internet]. 1994 Feb 1 [cited 2021 Apr 18];70(2):192–202. Available from: <https://europepmc.org/article/med/7511187>
47. Pardo A, Cabrera S, Maldonado M, Selman M. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. 2016;
48. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- and promotes tumor invasion and angiogenesis [Internet]. 2000 [cited 2021 Apr 18]. Available from: www.genesdev.org
49. Lama V, Moore BB, Christensen P, Toews GB, Peters-Golden M. Prostaglandin E 2 Synthesis and Suppression of Fibroblast Proliferation by Alveolar Epithelial Cells Is

Cyclooxygenase-2-Dependent. [cited 2021 Apr 17]; Available from: www.atsjournals.org

50. Gabasa M, Royo D, Molina-Molina M, Roca-Ferrer J, Pujols L, Picado C, et al. Lung Myofibroblasts Are Characterized by Down-Regulated Cyclooxygenase-2 and Its Main Metabolite, Prostaglandin E2. [cited 2021 Apr 17]; Available from: www.plosone.org

51. Kruglikov IL, Scherer PE. Caveolin-1 as a target in prevention and treatment of hypertrophic scarring. *npj Regen Med* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Apr 17];4(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0071-x>

52. Paula A, Masseno B, Porto CD. Myofibroblasts: a review. 17(2):177–90.

53. Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and Homeostasis: A Balancing Act*. 2001 [cited 2021 Apr 17]; Available from: <http://www.jbc.org>

54. Shi Y, Wang Y, Shao C, Huang J, Gan J, Huang X, et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses [Internet]. Vol. 27, *Cell Death and Differentiation*. Springer Nature; 2020 [cited 2021 Apr 17]. p. 1451–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32205856/>

55. Hellman U, Karlsson MG, Engström-Laurent A, Cajander S, Dorofte L, Ahlm C, et al. Presence of hyaluronan in lung alveoli in severe Covid-19: An opening for new treatment options? *J Biol Chem* [Internet]. 2020 Nov 6 [cited 2021 Apr 17];295(45):15418–22. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925817503713/fulltext>

8.0 ANEXOS

Anexo 1: Parecer consubstanciado da CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COVID19

Caracterização clínica e epidemiológica de pacientes atendidos em Curitiba-PR

Pesquisador: Cristina Pellegrino Baena

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 1

CAAE: 30188020.7.1001.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.944.734

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos nos documentos do protocolo.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 31 de Março de 2020

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Anexo 2: Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão tecidual de moléculas de adesão e de interleucinas, em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumopatias graves pandêmicas (Influenza A H1N1) e não-pandêmicas.

Pesquisador: Lúcia de Noronha

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 76401717.0.3001.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.550.445

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está objetivamente relatada, não havendo qualquer necessidade de outros esclarecimentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos necessários para a realização do projeto foram apresentados e estão em conformidade com a Resolução CNS N° 466 de 2012.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou ementas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Situação do Parecer:

Aprovado

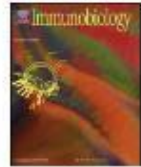
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 19 de Março de 2018

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho
UF: PR **Município:** CURITIBA **CEP:** 80.215-901
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br



The role of IL-17A/IL-17RA and lung injuries in children with lethal non-pandemic acute viral pneumonia



Marina Luise Viola Azevedo^a, Mineia Alessandra Scaranello Malaquias^{a,*},
Caroline Busatta Vaz de Paula^a, Cleber Machado de Souza^a, Victor Horácio Costa Júnior^a,
Sonia Mara Raboni^c, Renata Halila^a, Giuliana Rosendo^a, Priscilla Gozzo^a,
Leticia Arianne Panini do Carmo^a, Plínio Cézar Neto^a, Seigo Nagashima^a, Lucia de Noronha^{a,b}

^a Laboratory of Experimental Pathology, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná – PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil

^b Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná – UFPR, R. Padre Camargo, 280 – Alto da Glória, Curitiba, PR, Brazil

^c Virology Laboratory, Infectious Diseases Division, Federal University of Paraná – UFPR, R. Padre Camargo, 280 – Alto da Glória, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Virus
Target therapy
Cytokines
Monoclonal antibodies
Mortality
Childhood
Immunohistochemistry

ABSTRACT

This study aimed to evaluate IL-17A (interleukin 17A) and IL-17RA (IL-17A receptor) in a pediatric population that died with non-pandemic acute viral pneumonia compared to the non-viral pneumonia group. Necropsy lung samples (n = 193) from children that died after severe acute infection pneumonia were selected and processed for viral antigen detection by immunohistochemistry. After this, they were separated into two groups: virus-positive (n = 68) and virus-negative lung samples (n = 125). Immunohistochemistry was performed to assess the presence of IL-17A and IL-17RA in the lung tissue. The virus-positive group showed stronger immunolabeling for IL-17A and IL-17RA (p = 0.020 and p < 0.001, respectively). The result of this study may suggest that IL-17A and IL-17RA plays an essential role in the maintenance of viral infection and lung injuries. These aspects may increase the severity of the inflammatory response leading to lethal lung injuries in these patients. Children with community-acquired non-pandemic pneumonia that requiring hospitalization could benefit from using IL-17RA/IL-17A monoclonal antibodies to block their injurious effects.

1. Introduction

Acute respiratory infections are responsible for a high number of medical care and hospitalization cases in the world. Being, mostly viral etiology, represents a significant cause of morbidity and mortality, especially among children under five years of age (Cruz et al., 2006; Rudan et al., 2008; Lambert et al., 2008; Liu et al., 2012; McIntosh, 2002; Ruuskanen et al., 2011; Østergaard et al., 2018; Quan et al., 2007; Rudan et al., 2013).

Pneumonia is a generic term used to describe an acute inflammation of the lower respiratory tract (Cruz et al., 2006; Rudan et al., 2008; Lambert et al., 2008; Liu et al., 2012; McIntosh, 2002; Østergaard et al.,

2018; Quan et al., 2007; Rudan et al., 2013). Viruses and bacteria are the most common etiological agents, and an increased incidence of viral pneumonia in the last decade was observed, perhaps due to the emergence of new strains of virus and improvement of diagnostic techniques allowing precise virological diagnosis (Cruz et al., 2006; Lambert et al., 2008; Quan et al., 2007).

Many types of viruses are involved with hospitalization due to pneumonia. However, the most frequent agent identified in the lower respiratory tract infections is the Respiratory Syncytial Virus (RSV), which has a worldwide distribution and circulates mainly during the months of winter (Hall et al., 2009; Kneyber et al., 2000; Giordano et al., 2018; Shann, 1986).

Abbreviations: AdV, (Adenovirus); E. ESBL, (Escherichia coli, Extended Spectrum Beta Lactamases); FFPE, (Formalin fixed paraffin embedded); FLU, (Influenza); IL-17A, (Interleukin 17A); IL-17R, (IL-17 Receptor Family); IL-17RA, (IL-17A Receptor); K. ESBL, (Klebsiella pneumoniae, Extended Spectrum Beta Lactamases); PCR, (Polymerase Chain Reaction); PIV, (Parainfluenza); RSV, (Respiratory Syncytial Virus); TMA, (Tissue Microarray)

* Corresponding author.

E-mail addresses: marina.azevedo@pucpr.br (M.L.V. Azevedo), mi.mv@hotmail.com (M.A.S. Malaquias), carolbvaz@gmail.com (C.B.V. de Paula), cleberias@gmail.com (C.M. de Souza), victor.costa@pucpr.br (V.H.C. Júnior), raboni.sonia@gmail.com (S.M. Raboni), rhalila@hotmail.com (R. Halila), giulianarosendo@hotmail.com (G. Rosendo), priscillagozzo@hotmail.com (P. Gozzo), lepanini.jp@gmail.com (L.A.P. do Carmo), pnetoc17@gmail.com (P.C. Neto), seigo.nagashima@hotmail.com (S. Nagashima), lnno.noronha@gmail.com (L. de Noronha).

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151981>

Received 5 April 2020; Received in revised form 14 June 2020; Accepted 4 July 2020

Available online 06 July 2020

0171-2985/ © 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Another virus related to cases of respiratory infection is the Adenoviruses that are frequent causes of self-limiting upper respiratory tract infections (Shatizadeh Malekshahi et al., 2017). Adenoviral lower respiratory tract infections are infrequent, sporadic, and most commonly associated with Adenoviruses types 3, 5, and 7 (Crabtree et al., 1997; Esposito et al., 2016; Khanal et al., 2018; Madhi et al., 2000; Murtagh et al., 1993).

Influenza epidemics and pandemics pose a severe health problem worldwide, and the fact that specific segments of the population are more susceptible to severe infections may increase morbidity and mortality (Elf et al., 2018; Kumar et al., 2018; Neumann et al., 2009; Payne, 2017; Taubenberger and Kash, 2010).

The interleukin-17 family is composed of six members; IL-17A-F. This cytokines family performs the signaling through the receptor family IL-17 (IL-17R), which includes five members called IL-17RA-E. Strong interactions between these components are observed, which contribute to the activation of several pathways, including those that might be responsible for the development of severe lung injury. Besides that, IL-17A and IL-17 F promote an inflammatory response that creates an environment that contributes to the lung disease's installation (Lai and Dong, 2016).

The IL-17A is a pro-inflammatory cytokine mainly derived from activated T cells, which has been associated with the neutrophil inflammation of the airways (Barlow et al., 2011; Fujita et al., 2012; Gaffen, 2009; Wiehler and Proud, 2007; Wong et al., 2010). IL-17A can also stimulate IL-8 production, which contributes to the exacerbation of neutrophils recruitment (de Souza Costa et al., 2014; Wiehler and Proud, 2007).

The IL-17A plays a role in the innate and adaptive immunity's connection through the link to a complex composed by the IL-17RA and IL-17RC subunits. These subunits mediate the signaling and result in the activation of pro-inflammatory mediators, such as the IL-1, IL-6, TNF, and IL-8 (Zrioual et al., 2009). Together with the IL-6, IL-17A also plays a role in the promotion of viral persistence, inhibiting the cellular apoptosis and the function of the cytotoxic T cells (Garraud et al., 2012; Hou et al., 2014; Sonego et al., 2016).

It was observed that not only IL-17A but also IL-17 F are capable of signaling IL-17RA to induce granulopoiesis factors secretion that lead to the expansion of the neutrophil precursors at the bone marrow and the spleen, as well as at the peripheral blood (Crowe et al., 2009).

The IL-17RA is expressed in high levels on the hematopoietic tissues (Awasthi and Kuchroo, 2009; Yao et al., 1995), and airways where it is mainly expressed by fibroblasts, epithelial cells, smooth muscle cells, and microvascular endothelial cells (Lorè et al., 2016). However, the expression's deficiency of this receptor showed in some murine models, has been associated with higher rates of survival when related to viral infections, following by the decrease of levels of IL-17A, resulting in a reduced neutrophilic infiltration that culminates in fewer tissues damage. These findings suggest that the therapeutic modulation of the IL-17RA's signaling can be beneficial in human lung acute infectious diseases (Willis et al., 2015).

Based on this possible involvement of the IL-17A/IL-17RA in the inflammatory and the anti-apoptotic process, we tested the hypothesis that the tissue expression of these proteins may have a role in inducing lung injuries in lethal non-pandemic acute viral pneumonia within the pediatric population.

Thus, this study aimed to analyze the tissue expression of the IL-17A and IL-17RA in necropsy lung samples, obtained from children with lethal non-pandemic acute viral pneumonia, and comparing it to the lethal non-viral acute pneumonia group.

2. Materials and methods

2.1. Study population

From the 794 pediatric cases involving necropsy (occurring between

1960 and 2004) and whose cause of death was lethal non-pandemic acute pneumonia, 193 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of lung tissue were selected. Samples were then classified into two groups considering the viral presence: virus-positive ($n = 68$) and virus-negative ($n = 125$) (Baurakiades et al., 2014; Chong et al., 2009; de Souza Costa et al., 2014; Debur et al., 2010). The ethics review board of the Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná reviewed and approved the study (register number 1099.138/2005; August 30, 2005).

In sequence, samples were categorized according to gender, age, seasonality, pathological pattern, and survival. Regarding the age, the patients were divided in children younger than 1 year and over 1 year old. To account for seasonality, we categorized the samples according to when the children's death occurred, if it was during cold or warm months. The pathological patterns were categorized as either bronchopneumonia or interstitial pneumonitis. Survival was defined as the period between the date of hospitalization and death.

All cases had already been tested for the presence of respiratory syncytial virus (RSV), adenovirus (AdV), parainfluenza 1, 2, and 3 (PIV1, PIV2, and PIV3) and influenza A and B (A FLU and B FLU) using immunohistochemistry (Baurakiades et al., 2014; Chong et al., 2009; de Souza Costa et al., 2014; Debur et al., 2010).

2.2. Immunohistochemical reactions

The tissue microarray (TMA) paraffin blocks were used to perform the immunohistochemical reactions containing two lung samples per case with a 3 mm diameter.

The primary antibodies anti-IL-17A (rabbit polyclonal; 1:600; from Bioss™) and anti-IL-17RA (rabbit polyclonal; 1:400; from Cloud-Clone Corp.) were used to observe the tissue expression of interleukin-17A and its receptor in the alveolar septa using immunohistochemistry. All immunohistochemistry assay included both a negative control (which was missing a primary antibody) and positive control.

An immunoperoxidase assay with modifications was part of the immunohistochemistry, as reported by Malaquias and colleagues, 2018. Antigen retrieval was performed using a BioSB™ Immunoretriever. Tissue samples were incubated with the primary antibodies (anti-IL-17A/IL-17RA) in a moist chamber at room temperature for one hour. Incubations with the secondary antibody (Dako Advance™ HRP System, DakoCytomation, Inc., CA, USA) were carried out for 30 min. Incubations with 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide substrate (DakoCytomation, Inc., CA, USA) were performed for 3 min to visualize positive staining.

Immunostained TMA slides were photographed using the Axion Scan.Z1 Scanner (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), and the image analysis was performed using Image-Pro Plus 4 software. For each sample, approximately 600 images were obtained using a 20x objective and, of these, approximately 500 were excluded, generating approximately 100 satisfactory images per animal for analysis. The positive control was chosen as a "mask," which contained adequate levels of tissue immunoreactivity. The mask was then superimposed on the sample images, and Image-Pro Plus 4 software identified the positive areas and transformed the results into positive immunoreactivity areas per square micrometer (μm^2). The area in μm^2 obtained using this method was divided by the observed field's total area, thus generating a percentage value for each image (Malaquias et al., 2018).

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (version 20.0). The results were expressed as the means, median, standard deviations, frequencies, or percentages. The Kruskal-Wallis non-parametric test was performed to compare the quantitative variables between groups. Fisher exact test or the chi-squared test was performed to compare the categorical variables between groups. Univariate survival analysis was

Table 1

Baseline characteristics of population and classification in two groups considering the viral presence.

Baseline characteristics		Virus-positive n = 68	Virus-negative n = 125	p-value
Age ^a		(1.7 + 2.8)	(1.8 + 3.1)	0.814*
Gender	Male	35 (51.5 %)	72 (57.6 %)	0.450**
	Female	33 (48.5 %)	53 (42.4 %)	
Seasonality	Warm months	24 (35.3 %)	47 (37.6 %)	0.751**
	Cold months	44 (64.7 %)	78 (63.4 %)	
Hemoculture	Positive	40 (58.8 %)	26 (52.0 %)	0.574**
	Negative	28 (41.2 %)	24 (48.0 %)	
Pathological patterns	Bronchopneumonia	50 (73.5 %)	101 (80.8 %)	0.242**
	Interstitial pneumonitis	18 (26.5 %)	24 (9.2 %)	
Survival time (days) ^a	—	12.9 + 6.8	13.9 + 6.9	0.340***
IL-17A expression ^{†‡}	—	3.47 + 2.99	2.49 + 1.91	0.020**
IL-17RA expression ^{†‡}	—	4.28 + 5.19	1.24 + 2.36	< 0.001**
CD4+ cells ^{††}	—	10	8	0.609**
CD8+ cells ^{††}	—	17	9	0.042**
CD14+ cells ^{††}	—	21.5	46	0.077**
CD25+ cells ^{††}	—	1	1	0.535**
CD74+ cells ^{††}	—	76.5	79	0.895**

* T-Student test; **Fisher Chi Square; ***Wilcoxon test; ^aMean + SD; [†]tissue expression of IL-17A and IL-17RA in %; ^{††}Number of positive cells per 40 HPFs (median) from de Souza Costa et al., 2014; IG, gestational age.

done with the Kaplan-Meier method and the Log-rank test. Multivariate analysis was performed, including variables with $p < 0.20$. Statistical significance was p values < 0.05 .

3. Results

The study population was 193 pediatric necropsies (107 males and 86 female) divided in virus-positive ($n = 68$; 35.2 %) and virus-negative groups ($n = 125$; 76.5 %). Clinical characteristics such as age, gender, seasonality, anatomopathological patterns, survival, and IL-17A/IL-17RA tissue expression are listed in Table 1.

Regarding seasonality, 63.2 % (122) of the sample was concentrated in the colder months, and 36.8 % in the months considered warm.

Clinical manifestations of all patients ($n = 193$) presented at diagnosis were fever ($n = 4$, 3.3 %), cough ($n = 28$, 23.0 %), fever and cough ($n = 29$, 23.8 %), and acute respiratory insufficiency ($n = 61$, 50.0 %). Clinical manifestations were compared to IL-17A/IL-17RA tissue expression without significant results (data not shown).

Blood cultures for bacteria were performed in all of the cases of the virus-positive group, and positive results were found in 40 (58.82 %) of 68 cases. In the virus-negative group, we had 52 of 125 patients who did hemoculture (41.60 %), and 27 (51.92 %) had positive results. The bacteria identified in both groups were: *Escherichia coli*, *Escherichia coli* - Extended-Spectrum Beta-Lactamases (E. ESBL), *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* - Extended-Spectrum Beta-Lactamases (K. ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*. Blood culture for bacterial results was compared to IL-17A/IL-17RA tissue expression without significant results (data not shown).

Survival time did not show statistical differences between the two groups.

Virus-positive cases showed strong tissue expression of IL-17A compared to virus-negative cases ($p = 0.020$). The same results were found for IL-17RA ($p < 0.001$) (Table 1; Fig. 1 and 2).

In Table 2 is shown the type of virus that was found in the study population and its relationship with IL-17A/IL-17RA tissue expression. Parainfluenza 2 ($p = 0.050$) and influenza A ($p = 0.025$) showed significantly higher tissue expression of IL-17A when compared to the virus-negative group. Another type of virus did not show differences when IL-17A tissue expression was compared with the virus-negative group. All of the types of the virus showed significantly higher tissue expression of IL-17RA when compared to the virus-negative group. Viral co-infection was observed in 41 (57.7 %) cases.

Table 3 shows the association of the IL-17A/IL-17RA tissue

expression and the baseline characteristics of the patients. No significant results were found.

We accessed the CD4 +, CD8 +, CD14 +, CD25 +, and CD74 + cells count from another study with the same population (de Souza Costa et al., 2014). There is no correlation between the IL-17A/IL-17RA tissue expression and the cell infiltrations in the tissue samples.

4. Discussion

Many cytokines are involved in an increase in viral persistence and elevated cell response in pulmonary injuries (Baurakiades et al., 2014; de Souza Costa et al., 2014). This retrospective study describes the IL-17A/IL-17RA lung tissue expression in children with lethal non-pandemic acute viral pneumonia.

The predominant histological pattern, even in samples with viral positivity, was bronchopneumonia (Table 1), although without statistical significance. This morphologic pattern is characteristic of bacterial pulmonary infections. However, it has also been described for virus pneumonia. Some authors have been shown that a significant percentage of bronchopneumonia diagnostics in intensive care units are not bacterial and probably have a virus-like primary etiological pathogen. Besides, the respiratory viruses support the entry and spread of bacteria systemically and locally. In a prospective study, the incidence of bacterial co-infections showed a more severe clinical course (Herfst et al., 2017; McCullers, 2014; Takala et al., 1993; Thorburn et al., 2006).

Our results show 67 pediatric patients (Table 1) with positive blood cultures for bacteria, even in virus-positive as in the virus-negative group. Our findings showed that more than 50 % of patients tested for bacterial blood cultures had positive results independent of the presence of the virus. These bacterial types are commonly found in infectious processes and may be secondary infection after viral infection (Herfst et al., 2017; McCullers, 2014; Takala et al., 1993; Thorburn et al., 2006). However, IL-17A deficiency might protect from some bacterial lung infection because some type of bacteria might drive IL-17A functions during pulmonary infection (Wonnemberg et al., 2016).

IL-17A is produced mainly by the CD4 + T cells, but epithelial cells, fibroblasts, and endothelial cells also produce this cytokine (Cai et al., 2019; Kennedy et al., 1996). In virus-positive cases of children with lethal acute viral pneumonia, the higher IL-17A tissue expression was statistically significant ($p = 0.020$; Table 1) compared to virus-negative cases. The roles of Th17 effector cytokines in host defense have been extensively reviewed. Ye and colleagues (2001) demonstrated that IL-17RA $-/-$ mice are highly susceptible to pulmonary infection with *K. pneumoniae* (Ye et al., 2001). IL-17A may promote viral persistence by

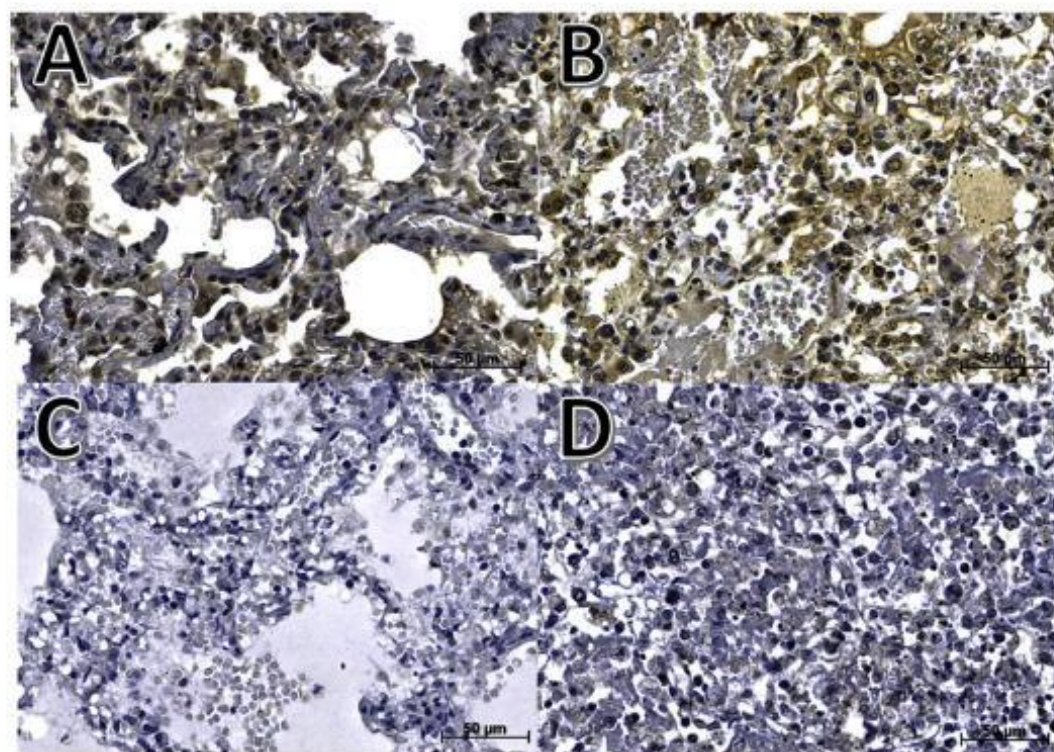


Fig. 1. Immunohistochemistry reaction for virus-positive x virus-negative samples. [A] Immunohistochemical reaction with anti-IL-17A antibody in virus-negative group sample. [B] Immunohistochemical reaction with anti-IL-17A antibody in virus-positive group sample. [C] Immunohistochemical reaction with anti-IL-17RA antibody in virus-negative group sample. [D] Immunohistochemical reaction with anti-IL-17RA antibody in virus-positive group sample. The image was taken using the Zeiss AxioScan slide scanner on a 20x magnification lens.

inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function, and have a synergistic upregulation, with IL-6, of the expression of Bcl-2 and Bcl-xL (Hou et al., 2014). Thus, IL-17A playing roles in the inflammatory response as well as resistance to apoptosis activity against virus-infected cells.

An interesting feature was the association of IL-17A tissue expression with some of the viral types. The parainfluenza 2 (PIV2) showed a borderline significance ($p = 0.050$; Table 2), demonstrating higher IL-17A tissue expression compared to the virus-negative group. Parainfluenza virus infections generate an aberrant increase in the production of specific cytokines by the infected cells, although lung fibroblast cell cultures infected with this virus did not show any significant change in the IL-17A production (Aljurayyan et al., 2018; Yoshizumi et al., 2010).

Seasonal influenza epidemics caused by influenza A and B viruses occur annually during the winter in temperate regions, resulting in around 3–5 million cases of severe illness and 250,000–500,000 deaths worldwide every year (World Health Organization, 2014). FLU A respiratory infection elicits a robust immune response, which is required for efficient virus clearance, but at the same time can contribute to lung damage and enhanced morbidity (Eichelberger et al., 1991; Graham and Braciale, 1997; Schmidt and Varga, 2018). Neutrophilia in FLU A infections have been reported, and some authors have reported a serological increase of IL-17A, leading to excessive recruitment of neutrophils into the airways associated with quite a significant lung tissue damage. Therefore, modulation of Th17 immunity by influenza viruses enhances lung pathology and susceptibility to secondary bacterial pneumonia producing an increase of mortality (de Souza Costa et al., 2014; Sichelstiel et al., 2014). Different from other serological results, our work could demonstrate the expression of IL-17A in lung tissues of children with lethal acute viral pneumonia and could observe that the FLU A positive patients have significantly higher IL-17A tissue

expression when compared to virus-negative group ($p = 0.025$; Table 2). Besides, this result could not be seen in other types of virus, suggesting that FLU A is more able to induce IL-17A local tissue expression and consequently to recruit neutrophils causing severe lung damage.

The IL-17A/IL-17RA interaction does not happen in a particular way. Receptor A interacts with the IL-17B and A, and the IL-17A, beyond connecting to the receptor A, also interacts with other IL-17 receptor variants, which makes the regulation and maintenance of the inflammatory process more complex. Furthermore, IL-17A and IL-17 F are crucial interleukins for the promotion of the inflammatory process on the lung tissue, and both of them are capable of interacting with the IL-17RC. Consequently, not only receptor A but also receptor C orchestrate the lung tissue's defense. Besides, the literature lacks essays on the repercussions of the IL-17RA in acute diseases. Regarding chronic diseases, the relation between the increase of the IL-17RA's concentration and a worsening of survival (Kostareva et al., 2019). This study verified that children with lethal acute viral pneumonia present a higher expression of IL-17RA ($p < 0.001$; Table 1). Another finding is that all of the types of viruses have higher tissue expression of IL-17RA compared to the negative-virus group, suggesting that the viral lung infection could increase the IL-17RA expression but not a specific viral type (Table 2).

Besides IL-17A/IL-17RA tissue expression seem to be related to severe lung injury; we did not observe an association between IL-17A/IL-17RA and survival time (Table 3).

The IL-17RA configures itself as a vital target therapy, once it has interactions with subunits of the IL-17R family and IL-17 variants, improving response to injuries (Chen et al., 2016; Gaffen, 2009). It is highly expressed in organs with lymphatic functions like thymus, spleen, and bone marrow. However, it has lower expression in guts and

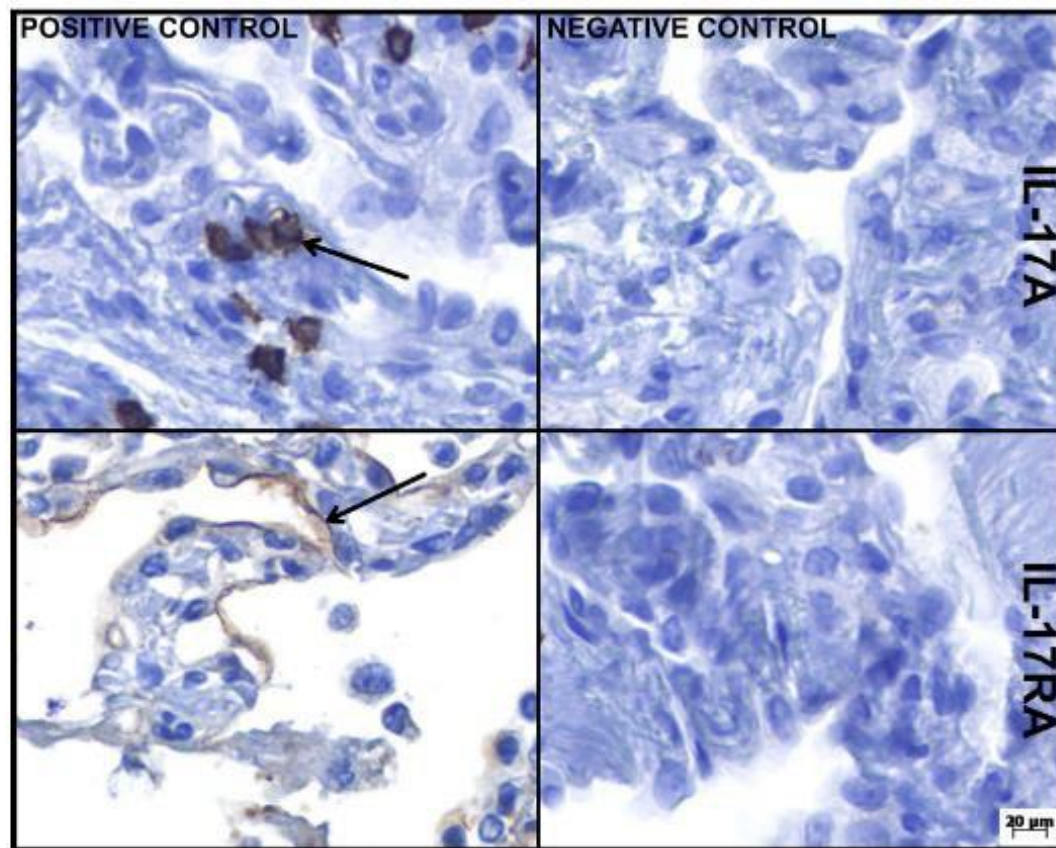


Fig. 2. Immunohistochemistry reaction for negative and positive control. Immunohistochemical reaction with anti IL-17A and anti-IL17RA antibody in a lung sample of the child, five years old that died of bacterial meningitis, not involving lung lesions. The black arrows are showing T lymphocytes expressing IL-17A and pneumocytes expressing IL-17RA respectively. The image was taken using the Zeiss AxioScan slide scanner on a 40x magnification lens.

lungs (Iwakura et al., 2008). It constitutes a pathway to inhibit the binding of IL-17RA with the expressed interleukin (Pinter et al., 2019). Three available drugs would be useful in the therapy to reduce the effects of the IL-17A, being the secukinumab and the ixekizumab, and the brodalumab, a receptor-specific blocker. These monoclonal antibodies are mainly destined to control rheumatoid arthritis and have their action maximized within two weeks of use (Kostareva et al., 2019).

We cannot forget that IL-17A can interact with other receptors like IL-17RC, which represents a new component that has not yet been studied profoundly but has a critical role in the pathway of pulmonary diseases (De Luca et al., 2017; Ho and Gaffen, 2010). So, blocking IL-

17RA does not mean blocking all the effects of IL-17A, and the use of a combination of blocking IL-17A/IL-17RA could be necessary. Our results show that it is a higher local tissue expression of IL-17/IL-17RA in the lungs of children with lethal acute viral pneumonia, and this fact has been described in the literature. Mainly based on serological results and murine models (Yanagisawa et al., 2016), it has been reported that in lung injuries, the expression of this proteins was higher and has been linked to many other factors like the development of interstitial pulmonary fibrosis, facilitating viral infections and having an essential role in the primary graft dysfunction of lung transplantation (Somers et al., 2015; Zhang et al., 2019). Given that, we believe that children with community-acquired non-pandemic pneumonia that requiring

Table 2
Types of virus and tissue expression of IL-17A and IL-17RA.

Type of virus	IL-17A					IL-17RA				
	Virus positive group		Virus negative group		p-value*	Virus positive group		Virus negative group		p-value*
	n	Mean + SD [†]	n	Mean + SD [†]		n	Mean + SD [†]	n	Mean + SD [†]	
RSV	41	3.23+2.88	114	2.50+1.91	0.136	37	3.60+4.33	85	1.24+2.36	0.0001
AdV	23	2.83+2.68	114	2.50+1.91	0.569	21	6.09+6.81	85	1.24+2.36	0.0003
PIV 1	11	2.84+2.85	114	2.50+1.91	0.694	10	4.41+5.35	85	1.24+2.36	0.0273
PIV 2	16	4.40+3.53	114	2.50+1.91	0.050	15	4.54+4.70	85	1.24+2.36	0.0004
PIV 3	25	3.21+2.82	114	2.50+1.91	0.233	22	4.21+5.06	85	1.24+2.36	0.0001
A FLU	17	4.48+3.28	114	2.50+1.91	0.025	14	3.12+2.89	85	1.24+2.36	0.0005
B FLU	13	3.75+2.79	114	2.50+1.91	0.136	12	2.40+2.23	85	1.24+2.36	0.0078

^a Pearson Chi Square; ^b Tissue expression of IL-17A and IL-17RA (%); RSV, respiratory syncytial virus; AdV, adenovirus; PIV, parainfluenza; FLU, influenza.

Table 3

Baseline characteristics of the population and to the tissue expression (pattern = weak and strong) of IL-17A/IL-17RA.

Baseline characteristics	IL-17A (weak) [†]	IL-17A (strong) [†]	p-value [*]	IL-17RA (weak) [†]	IL-17RA (strong) [†]	p-value [*]
Age						
< 1 year	53 (60.2 %)	56 (62.9 %)	0.713	42 (30.0 %)	39 (27.9 %)	0.732
> 1 year	35 (39.8 %)	33 (37.1 %)		28 (20.0 %)	31 (22.1 %)	
Gender						
Male	46 (52.3 %)	53 (59.6 %)	0.329	35 (25.0 %)	40 (28.6 %)	0.498
Female	42 (47.7 %)	36 (40.4 %)		35 (25.0 %)	30 (21.4 %)	
Seasonality						
Warm months	33 (37.5 %)	32 (36.0 %)	0.831	29 (20.7 %)	26 (18.6 %)	0.729
Cold months	55 (62.5 %)	57 (64.0 %)		41 (29.3 %)	44 (31.4 %)	
Pathological patterns						
Bronchopneumonia	65 (73.9 %)	75 (84.3 %)	0.089	52 (37.1 %)	56 (40.0 %)	0.546
Interstitial pneumonia	23 (26.1 %)	14 (15.7 %)		18 (12.9 %)	14 (10.0 %)	
Survival time (days) [§]	13.5 ± 6.8	13.0 ± 7.1	0.563	14.0 ± 6.8	13.2 ± 7.5	0.532

^{*} Pearson Chi Square; [§]Mean ± SD; [†]Classification in weak and strong based on the median of tissue expression of IL-17A and IL-17RA (IL-17A = 2.16; weak < 2.16 and strong > 2.16; IL-17RA = 0.78; weak < 0.78 and strong > 0.78).

hospitalization could benefit from using IL-17RA/IL-17A monoclonal antibodies to block their injurious effects.

It is worth remembering that this study has evaluated the tissue protein expression by immunohistochemistry from a single unique moment (death). So, the technique used and results reflect the time of death of these individuals, and, in this case, it is up to us to interpret the findings and make conjectures.

Some future perspectives in the management of pediatric patients could be suggested, such as identifying viral types early in life. An important aspect is the ever-present use of molecular biology tech. Among them, polymerase chain reaction (PCR) is frequently used for screening virus infection. Since proper management of these patients depends on early diagnosis and differentiation from other conditions, PCR may be a valuable tool (Iankester et al., 2002; Resa et al., 2014). More recently, the development of real-time PCR assays allowed the quantification of the virus. The determination and blood monitoring of the virus may be necessary for the treatment and prognosis of these infections and is becoming widely accepted, especially for the pediatric population. Besides, the incorporation of new agents that aim to block the actions of IL-17A is a promising way of treating some conditions. Genovese and colleagues (2010) showed that LY2439821-humanised anti-IL-17A monoclonal antibody, when added with oral disease-modifying anti-rheumatoid drugs, improves the signs and symptoms of rheumatoid arthritis (Genovese et al., 2010). Thus, we have new tools that help to improve the management of this group of susceptible patients.

5. Conclusion

Our results show that the presence of different types of viruses could indirectly stimulate higher IL-17A/IL-17RA expression levels. This increased IL-17A/IL-17RA tissue expression was causing excessive attraction of neutrophils, which might be contributing to increased damage to the lung tissue. However, the more significant presence of IL-17A was also preventing apoptotic defense mechanisms of the infected lung cell. Thus, the viral infection process would remain present longer so that the infection could reach the lower lung portions. Therefore, IL-17A/IL-17RA contributes to the onset and progression of lung tissue damage, bringing high rates of mortality. Furthermore, reducing the release of IL-17A might be a therapeutic option in some bacterial pneumonia, a common co-infection in viral lung injury. So, the present study aimed to understand the role of the IL-17A/IL-17RA complex on viral and non-viral pneumonia, to direct the therapeutic target, once there are monoclonal antibodies available acting on this complex. The possibility of blinding one or the other through a more specific method according to the characteristics of the disease makes the choice of the appropriate drug easier, rendering the treatment process more effective.

Funding

This work was supported by productivity research level 2 of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [LN].

Ethics approval and consent to participate

The ethics review board of the HC-UFPR reviewed and approved the study. Register number 1099.138/2005; August 30, 2005.

Author contributions

MLVA performed the immunohistochemistry, was responsible for the analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. MASM analyzed the data and contributed to the writing of the manuscript, and CBVP is a Ph.D. student of our group and supported us in all experiments and article writing. CMS assisted with statistical analysis data, contributed to the writing of the manuscript and the results tables. SMR was responsible for collecting and preparing the patient's samples and PCR to confirm the virus's presence. VHCJ provided the medical records with the data needed for analysis. RH, GR, and PCG are graduate students and provided operational support. SN assisted in obtaining and preparing the morphometry and images. LN supervised the project and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgment

The authors express their gratitude to Dra. Márcia Olandoski for performing the statistical analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151981>.

References

- Aljarrayan, A., Puksuriwong, S., Ahmed, M., Sharma, R., Krishnan, M., Sood, S., Davies, K., Rajashekhar, D., Leng, S., McNamara, P.S., Gordon, S., Zhang, Q., 2018. Activation and induction of antigen-specific T follicular helper cells play a critical role in live-attenuated influenza vaccine-induced human mucosal anti-influenza antibody response. *J. Virol.* 92, 114–118.
- Awasthi, A., Kuchroo, V.K., 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int. Immunol.* 21, 489–498.
- Barlow, J.L., Flynn, R.J., Ballantyne, S.J., McKenzie, A.N.J., 2011. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperactivity. *Clin. Exp.*

- Allergy 41, 1447–1455.
- Baurakiades, E., Costa, V.H., Raboni, S.M., De Almeida, V.R.T., Larsen, K.S.K., Kohler, J.N., Gazo, P., do, C., Klassen, G., Manica, G.C.M., De Noronha, L., 2014. The roles of ADAM33, ADAM28, IL 13 and IL-4 in the development of lung injuries in children with lethal non-pandemic acute infectious pneumonia. *J. Clin. Virol.* 61, 585–589.
- Cai, T., Qiu, Jinxin, Ji, Y., Li, W., Ding, Z., Suo, C., Chang, J., Wang, J., He, R., Qian, Y., Guo, X., Zhou, L., Sheng, H., Shen, L., Qiu, Ju, 2019. IL-17-producing ST2⁺ group 2 innate lymphoid cells play a pathogenic role in lung inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91, 6749, 30453–30456.
- Chen, K., Eddens, T., Trevejo-Nunez, G., Way, E.E., Elsegeiny, W., Ricks, D.M., Garg, A.V., Erb, C.J., Bo, M., Wang, T., Chen, W., Lee, J.S., Gaffen, S.L., Kolls, J.K., 2016. IL-17 receptor signaling in the lung epithelium is required for mucosal chemokine gradients and pulmonary host defense against *K. pneumoniae*. *Cell Host Microbe* 20, 596–605.
- Chong, D.C., Raboni, S.M., Abujamra, K.B., Marani, D.M., Nogueira, M.B., Tsuchiya, L.R.V., Neto, H.J.C., Flizkowski, F.R.Z., de Noronha, L., 2009. Respiratory viruses in pediatric necropsies: an immunohistochemical study. *Pediatr. Dev. Pathol.* 12, 211–216.
- Crabtree, K.D., Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N., 1997. Waterborne adenovirus: a risk assessment. *Water Science and Technology* 35, pp. 1–6.
- Crowe, C.R., Chen, K., Pociask, D.A., Alcorn, J.F., Krivich, C., Enelow, R.I., Ross, T.M., Witzum, J.L., Kolls, J.K., 2009. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J. Immunol.* 183, 5301–5310.
- Cruz, A.T., Cazacu, A.C., McElride, L.J., Greer, J.M., Demmler, G.J., 2006. Performance characteristics of a rapid immunochromatographic assay for detection of influenza virus in children during the 2003 to 2004 influenza season. *Ann. Emerg. Med.* 47, 250–254.
- De Luca, A., Pariano, M., Cellini, B., Costantini, C., Villella, V.R., Jose, S.S., Palmieri, M., Borghi, M., Galosi, C., Paolice, G., Maiari, L., Fric, J., Zelante, T., 2017. The IL-17F/IL-17RC Axis Promotes respiratory allergy in the proximal airways. *Cell Rep.* 20, 1667–1680.
- De Souza Costa, V.H., Baurakiades, E., Viola Azevedo, M.L., Traiano, G., Kowal Rosales, J., Künze Larsen, K.S., Raboni, S.M., de Noronha, L., 2014. Immunohistochemistry analysis of pulmonary infiltrates in necropsy samples of children with non-pandemic lethal respiratory infections (RSV; ADV; PIV1; PIV2; PIV3; FLU A; FLU B). *J. Clin. Virol.* 61, 211–215.
- Debur, M.D.C., Raboni, S.M., Flizkowski, F.R.Z., Chong, D.C., Persicote, A.P., Nogueira, M.B., Rosele, L.V., De Almeida, S.M., De Noronha, L., 2010. Immunohistochemical assessment of respiratory viruses in necropsy samples from lethal non-pandemic seasonal respiratory infections. *J. Clin. Pathol.* 63, 930–934.
- Eichelberger, M., Allan, W., Zijlstra, M., Jaenisch, R., Doherty, P.C., 1991. Clearance of influenza virus respiratory infection in mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 174, 875–880.
- Elf, S., Auvinen, P., Jahn, L., Liikonen, K., Sjöblom, S., Saavalainen, P., Mäki, M., Ehoibodin, K.E., 2018. Development and evaluation of a rapid nucleic acid amplification method to detect influenza A and B viruses in human respiratory specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* S0732-8893 30119-6.
- Esposito, S., Zampiero, A., Bianchini, S., Mori, A., Scala, A., Tagliabue, C., Sciarabba, C.S., Fossali, E., Piralla, A., Principi, N., 2016. Epidemiology and clinical characteristics of respiratory infections due to adenovirus in children living in Milan, Italy, during 2013 and 2014. *PLoS One* 11, e0152375.
- Fujita, J., Kawaguchi, M., Kokubu, F., Ohara, G., Ota, K., Huang, S.K., Morishima, Y., Ishii, Y., Sato, H., Sakamoto, T., Hozawa, N., 2012. Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 744–750.
- Gaffen, S.L., 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 556–567.
- Garraud, K., Cleret, A., Mathies, J., Fiore, D., Gauthier, Y., Quesnel-Hellmann, A., Tournier, J.N., 2012. Differential role of the interleukin-17 axis and neutrophils in resolution of inhalational anthrax. *Infect. Immun.* 80, 131–142.
- Genovese, M.C., Van Den Bosch, F., Roberson, S.A., Bojin, S., Bagini, L.M., Ryan, P., Sloan-Lancaster, J., 2010. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* 62, 929–939.
- Giordano, S., Di Gangi, M., Failla, M.C., Bruno, L., Falcone, V., Dones, P., 2018. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and hypertransaminasemia. *Infect. Med.* 26, 81–84.
- Graham, M.B., Braciale, T.J., 1997. Resistance to and recovery from lethal influenza virus infection in B lymphocyte-deficient mice. *J. Exp. Med.* 186, 2063–2068.
- Hall, C.B., Weinberg, G.A., Iwane, M.K., Blumkin, A.K., Edwards, K.M., Staat, M.A., Aulinger, P., Griffin, M.R., Poehling, K.A., Erdman, D., Grijalva, C.G., Zhu, Y., Szilagyi, P., 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N. Engl. J. Med.* 360, 588–598.
- Hierft, S., Böhringer, M., Kuro, B., Lawrence, P., Lewis, N.S., Mina, M.J., Russell, C.J., Steel, J., de Swart, R.L., Menge, C., 2017. Drivers of airborne human-to-human pathogen transmission. *Curr. Opin. Virol.* 22, 22–29.
- Ho, A.W., Gaffen, S.L., 2010. IL-17RC: a partner in IL-17 signaling and beyond. *Semin. Immunopathol.* 32, 33–42.
- Hou, W., Jin, Y.-H., Kang, H.S., Kim, B.S., 2014. Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function. *J. Virol.* pii: JVI00724-14.
- Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H., 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.* 226, 57–79.
- Kennedy, J., Rossi, D.L., Zurawski, S.M., Vega, F., Kastelein, R., Wagner, J.L., Hanum, C.H., Zlotnik, A., 1996. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR + CD4-CD8-T cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 611–617.
- Khanal, S., Ghimire, P., Dhamoon, A.S., 2018. The repertoire of adenovirus in human disease: the innocuous to the deadly. *Biomedicine* 6, 30–42.
- Kneyber, M.C.J., Moll, H.A., De Groot, R., 2000. Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur. J. Pediatr.* 159, 399–411.
- Kostareva, O.S., Gabdulkhakov, A.G., Kolyadenko, L.A., Garber, M.B., Tishchenko, S.V., 2019. Interleukin-17: functional and structural features, application as a therapeutic target. *Biochemistry* 84, 193–205.
- Kumar, B., Asha, K., Khanna, M., Ronsard, L., Meseko, C.A., Sanicas, M., 2018. The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control. *Arch. Virol.* 163, 831–844.
- Lai, Y., Dong, C., 2016. Interleukin-17 family. *Encyclopedia Immunobiol.* 534–543.
- Lambert, S.B., Allen, K.M., Carter, R.C., Nolan, T.M., 2008. The cost of community-managed viral respiratory illnesses in a cohort of healthy preschool-aged children. *Respir. Res.* 9, 11.
- Lankester, A.C., van Tol, M.J.D., Claas, E.C.J., Vossen, J.M., Kroes, A.C.M., 2002. Quantification of adenovirus DNA in plasma for management of infection in stem cell graft recipients. *Clin. Infect. Dis.* 34, 864–867.
- Liu, L., Johnson, H.L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J.E., Rudan, L., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C., Black, R.E., 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379, 2151–2161.
- Lorb, N.L., Bragazzi, A., Cigana, C., 2016. The IL-17A/IL-17RA axis in pulmonary defence and immunopathology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 30, 19–27.
- Madhi, S.A., Schoub, B., Simmank, K., Blackburn, N., Klugman, K.P., 2000. Increased burden of respiratory viral associated severe lower respiratory tract infections in children infected with human immunodeficiency virus type-1. *J. Pediatr.* 137, 78–84.
- Malaquias, M.A.S., Oyama, L.A., Jericó, P.C., Costa, I., Padilha, G., Nagashima, S., Lopes-Pacheco, M., Rebelato, C.L.K., Michelotto, P.V., Xisto, D.G., Brofman, P.R.S., Rocco, P.R.M., de Noronha, L., 2018. Effects of mesenchymal stromal cells play a role in the oxidant/antioxidant balance in a murine model of asthma. *Allergol. Immunopathol.* 46, 136–143.
- McCullers, J.A., 2014. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 252–262.
- McIntosh, K., 2002. Current concepts: community acquired pneumonia in children. *N. Engl. J. Med.* 346, 429–437.
- Murtagh, P., Cerqueira, C., Halse, A., Avila, M., Kajon, A., 1993. Adenovirus type 7b respiratory infections: a report of 29 cases of acute lower respiratory disease. *Acta Paediatr.* 82, 557–561.
- Neumann, G., Noda, T., Kawaoka, Y., 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931–939.
- Østergaard, M.S., Kjergaard, J., Kristensen, M.M., Reventlow, S., Poulsen, A., Isaeva, E., Akybekov, A., Sooronbaev, T., 2018. Recurrent lower respiratory illnesses among young children in rural Kyrgyzstan: overuse of antibiotics and possible under-diagnosis of asthma. A qualitative FRESH AIR study. *Care Respir. Med.* 28, 13.
- Payne, S., 2017. Family Orthomyxoviridae Viruses. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803109-4.00023-4>.
- Pinter, A., Bonnekoh, B., Hadziew, L.M., Zimmer, S., 2019. Brodalumab for the treatment of moderate-to-severe psoriasis: case series and literature review. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 12, 509–517.
- Quan, P.L., Palacios, G., Jabado, O.J., Conlan, S., Hirschberg, D.L., Pozo, F., Jack, P.J.M., Cisterna, D., Renwick, N., Ihul, J., Drysdale, A., Amos-Ritchie, R., Baumeister, E., Savv, V., Lager, K.M., Richi, J.A., Boyle, D.B., García-Sastre, A., Casas, I., Perez-Breña, P., Briese, T., Lipkin, W.L., 2007. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by greenchipresp oligonucleotide microarray. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2359–2364.
- Resa, C., Magro, S., Marechal, P., Barranger, C.D., Joannes, M., Miszczak, F., Vabret, A., 2014. Development of an efficient qRT-PCR assay for quality control and cellular quantification of respiratory samples. *J. Clin. Virol.* 60, 270–275.
- Rudan, I., Boschi-Pinto, C., Biloglav, Z., Mulholland, K., Campbell, H., 2008. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull. World Health Organ.* 86, 408–416.
- Rudan, I., O'Brien, K.L., Nair, H., Liu, L., Theodoratou, E., Qazi, S., Lukšić, I., Walker, C.L.F., Black, R.E., Campbell, H., 2013. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *J. Glob. Health* 3, 010401.
- Ruuskanen, O., Lahti, E., Jennings, L., Murdoch, D.R., 2011. Viral pneumonia. *Lancet* 377, 1264–1275.
- Schmidt, M.E., Varga, S.M., 2018. The CD8 T cell response to respiratory virus infections. *Front. Immunol.* 26, 81–84.
- Shann, F., 1986. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Pediatr. Infect. Dis.* 5, 247–252.
- Shattazadeh Malekshahi, S., Shafiei-Jandaghi, N.Z., Yavarian, J., Shadab, A., Nasiri, M., Mokhtari Azad, T., 2017. Detection of respiratory co-infections in children less than five years with adenovirus infection. *Arch. Pediatr. Infect. Dis.* 5, e36953.
- Sichelstiel, A., Yadava, K., Trompette, A., Salami, O., Iwakura, Y., Nicod, L.P., Marsland, B.J., 2014. Targeting IL-1β and IL-17A driven inflammation during influenza-induced exacerbations of chronic lung inflammation. *PLoS One* 9, e98440.
- Somers, J., Rutens, D., Verleden, S.E., Vandermeulen, E., Piloni, D., Wauters, E., Lambrechts, D., Vos, R., Verleden, G.M., Vanandenaerde, B., Van Raemdonck, D.E., 2015. Interleukin-17 receptor polymorphism predisposes to primary graft dysfunction after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* 34, 941–949.
- Silveira, F., Castanheira, F.V.S., Ferreira, R.G., Kanashiro, A., Leite, C.A.V.G., Nascimento, D.C., Colón, D.F., Borges, V., de, F., Alves-Filho, J.C., Cunha, F.Q., 2016. Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: protective and deleterious. *Front. Immunol.* 7, 155.
- Takala, A.K., Meurman, O., Kleemola, M., Kela, E., Rönberg, P.R., Eskola, J., Mäkelä, J.

- P.H., 1993. Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive haemophilus influenzae type b disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12, 189–195.
- Taubenberger, J.K., Kash, J.C., 2010. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 7, 440–451.
- Thorburn, K., Harigopal, S., Reddy, V., Taylor, N., Van, H.K.F., 2006. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax* 61, 611–615.
- Wiehler, S., Proud, D., 2007. Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293, L505–L515.
- Willis, C.R., Siegel, L., Leith, A., Moha, D., Escobar, S., Wannberg, S., Misara, K., Rickel, E., Rottman, J.B., Comeau, M.R., Sullivan, J.K., Metz, D.P., Tockler, J., Budelsky, A.L., 2015. IL-17RA signaling in airway inflammation and bronchial hyperreactivity in allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 53, 810–821.
- Wong, C.K., Cao, J., Yin, Y.B., Lam, C.W.K., 2010. Interleukin-17A activation on bronchial epithelium and basophils: a novel inflammatory mechanism. *Eur. Respir. J.* 35, 883–893.
- Wonnerberg, B., Jungnickel, C., Honecker, A., Wolf, L., Voss, M., Bischoff, M., Tschernig, T., Herr, C., Bals, R., Beisswenger, C., 2016. IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with *P. aeruginosa*. *Innate Immun.* 22, 620–625.
- World Health Organization, 2014. Influenza Fact Sheet. World Health Organization website Available: <http://www.who.int/en/news-room/detail/14-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year>. Accessed 2018 Mar 29.
- Yanagisawa, H., Hashimoto, M., Minagawa, S., Takasaka, N., Ma, R., Moermans, C., Ito, S., Araya, J., Budelsky, A., Goodsell, A., Baron, J.L., Nishimura, S.L., 2016. Role of IL-17A in murine models of COPD airway disease. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 312, L1222–L1230.
- Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.M., Painter, S.L., Comeau, M.R., Cohen, J.L., Spriggs, M.K., 1995. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3, 811–821.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellen, J.E., Hagby, G.J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J.J., Kolls, J.K., 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194, 519–527.
- Yoshizumi, M., Kimura, H., Okayama, Y., Nishina, A., Noda, M., Tsukagoshi, H., Koizawa, K., Kurabayashi, M., 2010. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways (I κ B kinase and p38 MAPK) in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front. Microbiol.* 1, 124.
- Zhang, J., Wang, D., Wang, L., Wang, S., Roden, A.C., Zhao, H., Li, X., Prakash, X.Y.S., Matteson, F.L., Tschumperlin, D.J., Vassallo, R., 2019. Profibrotic effect of IL-17A and elevated IL-17RA in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid arthritis-associated lung disease support a direct role for IL-17A/IL-17RA in human fibrotic interstitial lung disease. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 316, L487–L497.
- Zrioual, S., Ecochard, R., Tournadre, A., Lenief, V., Cazalis, M.-A., Miossec, P., 2009. Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *J. Immunol.* 182, 3112–3120.

Anexo 4: Artigo publicado no periódico Hygeia – Revista Brasileira de Geografia e da Saúde, indexada 1980-1726, Qualis B1.

HYGEIA, ISSN: 1980-1726

Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde - <http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia>

**PANDEMIA E TERRITÓRIO: RITMO DE DIFUSÃO DA COVID-19 ENTRE MUNICÍPIOS
BRASILEIROS DE 25 DE FEVEREIRO A 11 DE MAIO DE 2020 DE ACORDO COM FATORES DE
PROXIMIDADE SOCIAL EXTRAMUNICIPAL**

**PANDEMIC AND TERRITORY: DIFFUSION RHYTHM OF COVID-19 AMONG BRAZILIAN MUNICIPALITIES
FROM FEBRUARY 25 TO MAY 11, 2020 ACCORDING TO EXTRAMUNICIPAL SOCIAL PROXIMITY
FACTORS**

Augusto dos Santos Pereira

Doutor em Geografia, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)

augustogeog@gmail.com

Caroline Busatta Vaz de Paula

Doutoranda em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR)

carolbvaz@gmail.com

Lucia de Noronha

Doutora em Medicina (Clínica Cirúrgica), Universidade Federal do Paraná (UFPR)

lno.noronha@gmail.com

Eduardo Vedor de Paula

Pós-doutor em Ordenamento Territorial, Departamento de Geografia da Universidade Federal do

Paraná (UFPR)

edugeo@ufpr.br

RESUMO

Diante da gravidade da pandemia de COVID-19 e da consequente necessidade de medidas sobre o padrão de difusão territorial da doença para balizamento de tomadas de decisão, o trabalho tem o objetivo de identificar de que forma fatores de proximidade social extramunicipal condicionam o grau de exposição das populações nos diferentes municípios brasileiros ao risco de contaminação por SARS-CoV-2. Para tanto, foram analisados dados referentes a hierarquia urbano-regional, concentração populacional, volume de riqueza, integração territorial por trânsito de bens e pessoas, bem como graus de relevância de turismo, comparando-os com as notificações realizadas entre 25 de fevereiro e 11 de maio de 2020. Os indicadores selecionados, com exceção do PIB *per capita*, apresentam relação clara com padrões temporais de exposição à introdução do vírus na população dos municípios brasileiros. Observa-se uma lógica topológica de difusão, em que, a despeito da distância, os municípios primeiramente afetados são aqueles com os mais altos graus de proximidade social extramunicipal, sendo seguidos por aqueles em seu entorno imediato. O trabalho contribui com a discussão sobre o padrão de difusão da COVID-19 ao apontar indicadores e limiares que delimitam classes de municípios com distintos graus de exposição ao risco ao longo do tempo.

Palavras-Chave: COVID-19. Coronavírus. Indicadores de Gestão Territorial. Proximidade Social.

ABSTRACT

Given the severity of the COVID-19 pandemic and the consequent need for measures on the pattern of territorial diffusion of the disease, to guide decision-making, the study aims to identify how factors of extra-municipal social proximity condition the degree of exposure of populations in different Brazilian municipalities to the risk of contamination by SARS-CoV-2. Therefore, through data science and geoprocessing tools, data regarding urban-regional hierarchy, population concentration, volume of wealth, territorial integration by transit of goods and people, as well as degrees of relevance of tourism were analyzed, comparing them with the notifications made between February 25 and May 11, 2020. The selected indicators, except for GDP per capita, present a clear relationship with temporal patterns of exposure to the introduction of the virus in the population of Brazilian municipalities. A

Recebido em: 27/05/2020

Aceito para publicação em: 18/08/2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/Hygeia16055064>

Hygeia v.16 p. 199 - 219, 2020 página 199

Características Infecciosas, Epidemiológicas e Clínicas da COVID-19

Em 31 de dezembro de 2019, 27 casos de pneumonia com etiologia desconhecida surgiram em Wuhan, província de Hubei, China. Quatro dias após o surgimento dos primeiros relatos (03/01/20), o número de casos dessa doença havia subido para 44. No dia 07 de janeiro de 2020, um novo tipo de coronavírus foi identificado na amostra de nasofaringe de um paciente pelas autoridades chinesas. Esse vírus respiratório, posteriormente, seria denominado de SARS-CoV-2, causador da doença intitulada COVID-19 (GE et al., 2020). No dia 11 de março do corrente ano, dada a rápida expansão do novo coronavírus pelo mundo e sua presença em cerca de 114 países, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado de pandemia (WHO, 2020).

O número de pessoas acometidas pelo SARS-CoV-2 tem crescido de forma exponencial desde o surto da COVID-19, até a propagação mundial (HUANG et al., 2020). A relação entre um paciente sabidamente infectado e o número de pessoas que este paciente consegue infectar, ou seja a taxa de transmissibilidade de um vírus (número básico de reprodução - R_0), é comumente utilizada para estimar a média do número de casos secundários gerados a partir do caso primário em uma população suscetível (LANA, 2020). A taxa de transmissibilidade é reflexo, principalmente das características biológicas do vírus bem como da suscetibilidade do hospedeiro. As estimativas de R_0 para SARS-CoV-2, variam de 1,6 a 4,1, isto é, cada paciente positivo para SARS-CoV-2 poderia contaminar em média, entre 1 a 4 pessoas (READ et al., 2020; LIU et al., 2020). Quando comparado com o Influenza A H1N1pdm09, observa-se que esta variação (R_0) gira em torno de 1,3 e 1,8, o que justificaria a tamanha disseminação da atual pandemia (INFOGRIPE, 2020).

Pacientes com COVID-19 podem apresentar quadros clínicos variáveis, desde infecções assintomáticas e leves (80% dos casos), a infecções graves e críticas (15 e 5% dos casos respectivamente) (ROKNI et al., 2020). Nos casos assintomáticos, não há qualquer sintoma clínico, porém o teste de PCR (do inglês *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) para SARS-CoV-2 é positivo. A progressão para quadros graves de COVID-19 pode levar principalmente a sintomas respiratórios. No entanto, sintomas cardiovasculares, gastrointestinais, neurológicos, hematológicos, entre outros têm sido descritos (ROTHAN; BYRAREDDY, 2020; VELAVAN; MEYER, 2020). Já nos casos críticos, o paciente pode vir a apresentar principalmente síndrome de angústia respiratória aguda (SARA) e alterações vasculares trombogênicas, exigindo o suporte de uma Unidade de Terapia Intensiva com a necessidade, entre outras, de ventilação mecânica e anticoagulação terapêutica (ZHANG et al., 2020). A mortalidade de adultos nos casos críticos pode ser superior a 50% (BULUT; KATO, 2020).

A pandemia de SARS-CoV-2 é única tendo em vista algumas peculiaridades notáveis do vírus, como a sua alta afinidade com receptores que são expressos por quase todos os tipos celulares do corpo humano, chamados receptores da angiotensina-conversase-enzima-2 (ACE-2) o que multiplica muito a sua capacidade de infecção e de produzir doença, aumentando as chances de contaminação de outros indivíduos (ROTHAN; BYRAREDDY, 2020). Além disso, as proteínas de superfície do SARS-CoV-2 (*spike proteins*) são proteínas muito glicosiladas e por isso apresentam baixa imunogenicidade o que dificulta o seu reconhecimento pelo sistema imunológico do paciente, aumentando ainda mais o tempo de doença e o de eliminação de partículas virais pelos infectados, perpetuando assim a pandemia. Em terceiro lugar, seu possível recente salto de um animal para os humanos determina uma taxa de 100% de suscetíveis, visto que a população mundial, como um todo não havia ainda entrado em contato com o SARS-CoV-2. Por último, a alta viabilidade no ambiente externo e, finalmente, a resposta imune adaptativa atrasada ao vírus significam que os pacientes são vetores desse vírus por longos períodos. Sendo assim, todos esses fatores podem contribuir para a disseminação rápida e sustentada do vírus (COSSARIZZA et al., 2020).

COVID-19, Proximidade Social e o Espaço Geográfico

Para a análise da difusão territorial da COVID-19, cujas características infecciosas, epidemiológicas e clínicas foram expostas acima, é relevante que se realize uma sucinta revisão do conceito de espaço geográfico e do papel da pesquisa em Geografia da Saúde, o que deve embasar a identificação dos caminhos metodológicos pertinentes ao objetivo do presente trabalho.

Nesse sentido, é preciso se destacar que os estudos de Geografia da Saúde têm crescido no Brasil nas últimas décadas (JUNQUEIRA, 2009). No que tange aos trabalhos relacionados ao comportamento geográfico de doenças infecto-parasitárias, a contribuição da disciplina tem sido ainda mais marcante a partir da constatação de que modelos uni-causais, baseados apenas na

exposição a agentes etiológicos, são insuficientes para a explicação da difusão dessas doenças, o que requer uma abordagem multicausal, em que as condições ambientais e sociais sejam levadas em conta (LEMOS; LIMA, 2002).

De fato, a concepção de espaço tomada nos estudos de saúde e epidemiologia atestam um movimento que parte de um cenário inicialmente mais biológico e natural, estático, para um mais suscetível a alterações, até uma concepção que reifica o papel das dinâmicas sociais em suas relações com as condições naturais (SILVA, 1997).

Assim sendo, fatores sociais (acesso a atendimento de saúde, condições socioeconômicas, infraestrutura, entre tantos outros), associados às condições ambientais e aos fatores etiológicos, com sua particular distribuição geográfica, são considerados nas análises sobre a incidência de doenças infectocontagiosas. Isso traz particular atenção sobre o quadro urbano, em que, muitas vezes, condições socioeconômicas precárias se associam a um ambiente significativamente adensado e com problemas de saneamento básico, em que condições de insalubridade podem ser facilitadoras no processo de difusão de doenças.

Nessa perspectiva, a distribuição desigual dos diversos objetos geográficos, tanto naturais como sociais, gera um contexto caracterizado por condições geográficas que contribuem para diferentes níveis de exposição das populações a fatores desencadeadores de doenças infectocontagiosas. Isso não se dá somente a partir da localização desses objetos, mas de sua interconexão, por inúmeros tipos de trânsito, sobretudo de pessoas.

Por essa razão, é pertinente a concepção de Milton Santos (1978), para quem o espaço geográfico é formado por fixos e fluxos, ou seja, por objetos geográficos (cidades, fazendas, pontes, estações de metrô, infraestruturas, florestas, bosques, praças etc.), e por deslocamentos e intercâmbios (informação, comandos, significados culturais, energia, bens, capital, pessoas etc.), de tal forma que as dinâmicas sociais condicionam o espaço, ao mesmo tempo que por ele são condicionadas, dialeticamente.

Assim, entende-se que os condicionamentos do espaço geográfico sobre os processos sociais podem ser uma chave explicativa particularmente importante para a presente pesquisa, uma vez que os estudos apontam para a premência de dinâmicas da sociedade no processo de difusão da epidemia de COVID-19, sobretudo no que tange a questões de proximidade/afastamento social.

O monitoramento da COVID-19 em centenas de países e os estudos científicos relacionados sugerem que, em meio à inexistência de vacina ou de tratamento medicamentoso de elevada eficácia para o impedimento de morbidade grave, ou para recuperação rápida do paciente, há uma relevância das estratégias de afastamento/isolamento social para controle da doença (OMS, 2020c; LEWNARD; LO, 2020). Conforme a OMS:

Medidas de distanciamento social e físico visam a retardar a propagação da doença pela interrupção de cadeias de transmissão do COVID-19 e impedindo que novas apareçam. Essas medidas garantem distância física entre as pessoas (de pelo menos um metro) e reduzem o contato com superfícies contaminadas, ao mesmo tempo que incentivam e sustentam a conexão social virtual dentro das famílias e comunidades. As medidas para o público em geral incluem a introdução de arranjos de trabalho flexíveis, como teletrabalho, ensino a distância, redução de aglomeração, fechamento de instalações e serviços não essenciais, blindagem e proteção para grupos vulneráveis, restrições de movimento local ou nacional e medidas de permanência em casa, e reorganização coordenada das redes de saúde e serviços sociais para proteger os hospitais. As medidas são utilizadas em conjunto com medidas protetivas individuais contra o COVID-19, como lavagem frequente das mãos e etiqueta da tosse (OMS, 2020c, s/p.).

Assim, ao se reconhecer o espaço geográfico não somente como produto da sociedade, mas como um condicionante de seus processos e dinâmicas, tem-se que diversos fixos e fluxos que caracterizam esse espaço podem servir de elemento explicativo tanto para a proximidade social, como para a consequente difusão territorial de uma doença altamente infecciosa como a COVID-19.

Nesse sentido, é possível se conceber que fatores como hierarquia urbana, patamar populacional, produção de riqueza, infraestrutura para transporte de passageiros, mobilidade de cargas e o turismo, desigualmente distribuídos entre os municípios brasileiros, podem compor fatores que permitem maior ou menor proximidade social entre os residentes de cada um dos territórios municipais com

conveniente a identificação do volume de trânsito de mercadorias entre os municípios do Brasil, e deles com o exterior. Produtos diversos partem e chegam aos municípios por diversos modais, tais como dutos (no caso de derivados de petróleo, por exemplo), trens, navios, aviões e caminhões, alguns desses mobilizando uma quantidade significativa de pessoas em trânsito, que, eventualmente, podem se tornar vetores de transmissão de doenças infectocontagiosas. No que tange às trocas comerciais entre municípios brasileiros, no entanto, tem-se restrição de acesso aos dados por sigilo fiscal das bases do Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Prestação de Serviços – ICMS. Por outro lado, os dados de exportação/importação dos municípios são acessíveis em plataforma do Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC, 2020).

Avançando sobre fatores de proximidade social extramunicipal, parece bastante razoável a concepção de que ela seja também condicionada pela mobilidade de pessoas por meio dos serviços de transporte de passageiros. Em relação aos serviços rodoviários e hidroviários, optou-se por utilizar o índice de proximidade, medida que visa a identificar quanto cada nó na rede rodoviária/hidroviária está ligado aos demais, por número de viagens de passageiros, conforme a pesquisa de Ligações Rodoviárias e Hidroviárias (IBGE, 2016).

A respeito dos dados sobre transporte aeroviário, foi utilizada a base da Agência Nacional de Aviação Civil (ANAC, 2020), que informa o número de passageiros em trânsito em cada aeroporto no Brasil. Ressalva-se que, em alguns casos, a base de dados foi alterada, de maneira que os passageiros de alguns municípios, foram atribuídos a outros, que tendem a ter maior proporção de participação efetiva nas origens e destinos. Assim, passageiros de Guarulhos e de São José dos Pinhais, por exemplo, foram atribuídos a São Paulo e Curitiba, respectivamente.

Por fim, optou-se por utilizar dados de turismo como um fator de proximidade social extramunicipal. Para tanto, foi feito uso de base do Ministério do Turismo (2019). O órgão classifica os municípios com participação no turismo nacional em cinco classes de relevância, tendo como critério o número de estabelecimentos e de trabalhadores formais no setor de hospedagem, mais estimativas do número de turistas (MINISTÉRIO DO TURISMO, 2020). As classes de relevância do turismo vão de A, a mais alta, até E, a mais baixa.

É importante salientar que os dados elencados têm origem em fontes oficiais consistidas. Quanto às notificações, entende-se que um intervalo de tempo adequado foi abrangido a ponto de permitir que o baixo número de testes praticados não configurasse um viés para os resultados.

Cabe mencionar ainda que, por convenção internacional, as semanas epidemiológicas são contadas de domingo a sábado. A primeira semana do ano é aquela que contém o maior número de dias do novo ano (PORTAL SINAN, 2020). Assim, no Brasil o primeiro caso de COVID-19 foi confirmado e registrado na nona semana epidemiológica de 2020. Ante o exposto, para facilidade argumentativa sobre as datas e períodos em que ocorrem o processo de difusão territorial da COVID-19, a data de 25 de fevereiro é considerada, no estudo, como início da primeira semana do evento. Ressalva-se, ainda, que as datas de notificação não correspondem às datas de transmissão/infecção.

Etapas de trabalho, técnicas e recursos

O fluxo de trabalho foi caracterizado por etapas de obtenção, tratamento, análise de dados, bem como divulgação dos resultados. Em cada etapa, foram aplicadas técnicas estatísticas, de Ciência de Dados e de geoprocessamento expostas no Quadro 1:

Quadro 1 – Etapas e técnicas utilizadas

Etapa	Técnica
Obtenção	Geração de algoritmo de obtenção automática de dados <i>on-line</i> (<i>web scraping</i>) e sua transformação em padrão matricial, condizente com operações tabulares.
Tratamento	Identificação de valores duplicados, outliers e faltantes. Compatibilização e junção de dados de diferentes bases a partir de indexação por código municipal do IBGE.
Análise	Análise exploratória e análise de comportamento temporal por exploração visual a partir de gráficos e mapas.
Divulgação	Elaboração de ambiente interativo, <i>on-line</i> , de acesso público em Pereira (2020).

Fonte: Elaborado pelo Autor

Entre os recursos computacionais utilizados para a viabilização desse estudo, destacam-se o *software* de geoprocessamento ArcGIS 9.3.2, as bibliotecas Pandas, Matplotlib, Seaborn e Geopandas, em linguagem Python, para tratamento e análise de dados tabulares, além de plotagem de gráficos e de mapas temáticos. Foram utilizados Jupyter *notebooks*, ambientes de programação interativa, para geração dos códigos-fonte e disponibilização pública *on-line*.

RESULTADOS: SUCESSÃO DAS PRIMEIRAS NOTIFICAÇÕES MUNICIPAIS EM RELAÇÃO ÀS MEDIDAS DE PROXIMIDADE SOCIAL EXTRAMUNICIPAL

Adiante são apresentados os resultados da pesquisa, com a identificação das semanas do evento epidêmico em que houve a primeira notificação em cada município afetado, ao longo do período analisado, em comparação com as medidas de proximidade social extramunicipal levantadas.

Ritmo de difusão da Epidemia de COVID-19 entre municípios brasileiros

Após quase três meses de difusão notificada de COVID-19 em diversos países, o Brasil apresentou sua primeira notificação, em São Paulo, no dia 25 de fevereiro de 2020. Em 11 de maio de 2020, apenas 76 dias após a primeira notificação, o Brasil já registrava 169.099 casos acumulados (COTA, 2020), com 11.123 óbitos e 67.384 recuperados (MS, 2020). Trata-se de um crescimento significativamente acelerado, o que, na data, colocava o Brasil entre os dez países com maior número de notificações no mundo (OMS, 2020b). O Gráfico 1 mostra a quantidade diária e acumulada de municípios com casos notificados no país.

Gráfico 1 – Incremento diário do número de municípios com casos notificados no Brasil

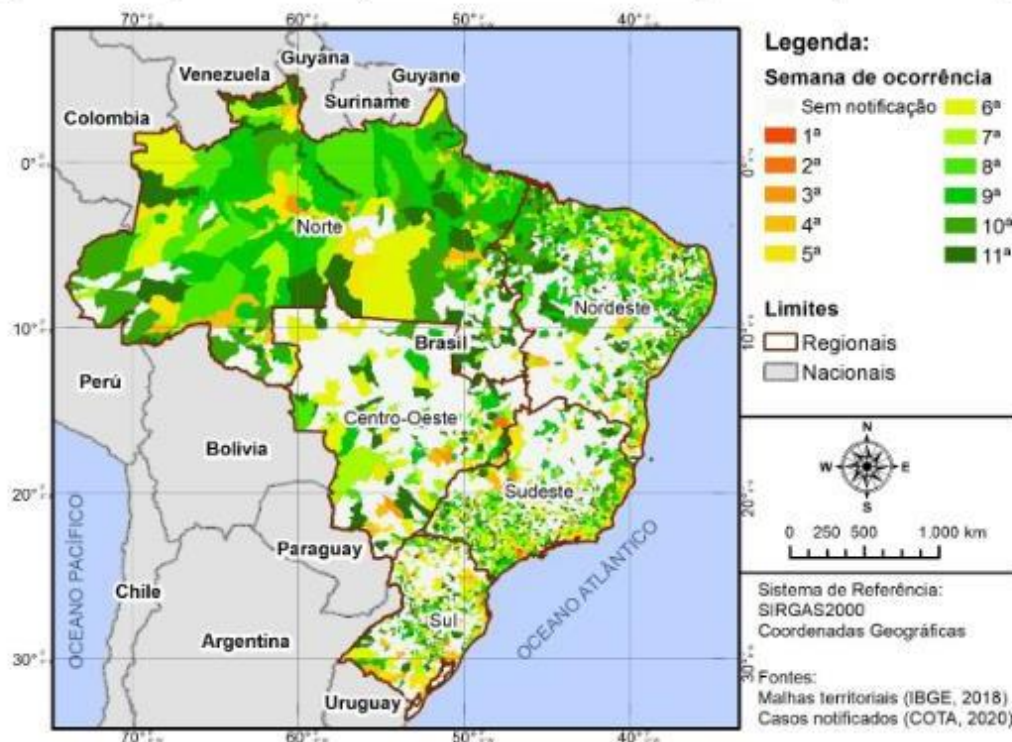


Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em IBGE (2008) e COTA (2020)

Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

No que tange à difusão territorial da COVID-19, nota-se que, no período de setenta e sete dias em análise, houve notificações em 2.820 municípios, 50,6% dos 5.570 municípios brasileiros, conforme o Gráfico 1. É possível observar, também, que, até a data, havia uma tendência de crescimento do número de novos municípios afetados por dia. Assim, em todo o período, houve uma média de 37 novos municípios atingidos pela COVID-19 diariamente, ao passo que, entre 1 e 11 de maio de 2020, esse valor médio foi de 71 novos municípios com seu primeiro caso notificado. A distribuição dos municípios afetados pode ser vista na Figura 1.

Figura 1 – Municípios brasileiros segundo a semana do evento em que houve a primeira notificação



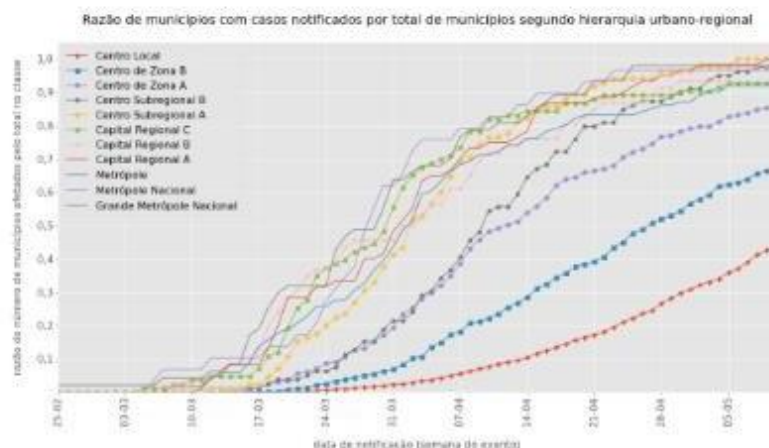
Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira.

A Figura 1 mostra que os casos de COVID-19 se encontravam distribuídos em municípios de todas as regiões do país, com algumas porções territoriais ainda sem notificações e com grande predominância de áreas contaminadas a partir da sexta semana do evento (a partir de 31 de março de 2020).

Difusão da COVID-19 entre os municípios segundo Hierarquia Urbana

A fim de identificar o papel da hierarquia urbana no controle da exposição das populações de diferentes municípios ao risco de contaminação, foi elaborado o Gráfico 2, que mostra a proporção de municípios afetados por dia, segundo a hierarquia urbana a que estão associados. O eixo vertical indica a razão de municípios por classe, com máximo em 1, o que denota 100% dos municípios de dada hierarquia com notificação em uma determinada data, representada no eixo horizontal. Fica evidente, por meio do Gráfico 2, que existem ritmos bastante distintos de registros de COVID-19 de acordo com a hierarquia urbana. De maneira geral, é possível se notar, ao longo do tempo, uma tendência de participação incremental da proporção municípios com casos notificados conforme o aumento de sua hierarquia.

Gráfico 2 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo hierarquia urbana associada



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em IBGE (2008) e COTA (2020)

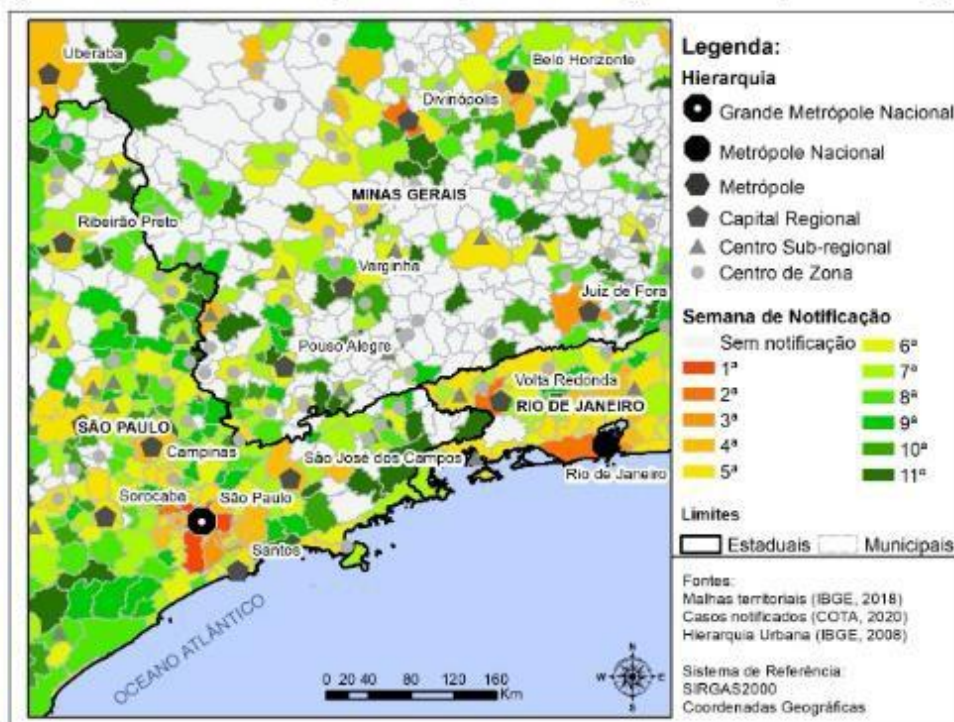
Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

Quatro grupos com ritmos bastante distintos são identificados. Um primeiro grupo é formado pelos municípios ligados à grande metrópole nacional (São Paulo), às metrópoles nacionais (Brasília e Rio de Janeiro), às metrópoles com influência regional (Manaus, Belém, Fortaleza, Recife, Salvador, Belo Horizonte, Curitiba, Goiânia e Porto Alegre)², capitais regionais (A, B e C), além de centros sub-regionais A. Esse primeiro grupo apresentava entre 85,3 e 100% de seus municípios com casos notificados de COVID-19 em 11 de maio de 2020, com um ritmo de crescimento bastante superior durante todo o período de presença de casos no Brasil. Um segundo grupo é formado por municípios ligados a centros sub-regionais B e centros de zona A, que chegaram a proporções de territórios com notificações tão elevadas quanto o primeiro grupo, mas em intervalo de tempo maior, por vezes de quinze dias. Os municípios dos centros de zona B foram afetados, proporcionalmente, em ritmo inferior, demorando, por vezes, vinte dias, para chegar na razão municípios afetados/total de municípios atingida por aqueles do primeiro grupo. Em 11 de maio, 67,5% desses municípios tinham casos registrados. Por fim, os municípios dos centros locais foram atingidos posteriormente, em relação àqueles das demais categorias de hierarquia urbana. Em 11 de maio, 43,8% desses municípios haviam sido afetados. É preciso ressaltar, no entanto, que essa é a classes com o maior número de municípios, o que significa um grande número absoluto de territórios afetados (1963 municípios).

Por meio da Figura 2, é possível observar, para um conjunto de municípios dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, que, de fato, essas unidades territoriais foram afetadas em momentos distintos, segundo sua hierarquia urbana.

² O IBGE (2008) considera as metrópoles (grande nacional, nacionais e regionais) como seus polos e classifica os municípios da aglomeração metropolitana como áreas de concentração de população. Tendo em vista a finalidade do presente trabalho de indicar ritmos de propagação dos casos de COVID-19 entre os municípios de diferentes grupos/classes, aqueles pertencentes ao entorno metropolitano foram classificados como metrópole. Assim, a indicação de quase 80% dos municípios da metrópole nacional com notificação na última data se refere a todos os municípios daquele aglomerado, conforme a classificação do estudo do instituto.

Figura 2 – Parcela dos municípios dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, segundo semana do evento em que houve a primeira notificação e a hierarquia urbano-regional



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira.

As metrópoles representadas na Figura 2, tiveram casos contabilizados no início da instalação da pandemia no Brasil. São Paulo teve casos na primeira semana, sendo, de fato, o primeiro município com casos notificados, enquanto o município do Rio de Janeiro foi afetado na semana seguinte, e Belo Horizonte na quarta semana.

Diversos municípios metropolitanos foram atingidos subsequentemente. No entorno de São Paulo, trinta e um municípios foram atingidos entre a segunda e a quinta semana do evento, entre os quais Ferraz de Vasconcelos, Carapicuíba, Mauá, São Caetano do Sul, Santo André, São Bernardo do Campo, Guarulhos, Osasco, Barueri, Cotia, Suzano, Vargem Grande Paulista e Mogi das Cruzes.

Ao redor do Rio de Janeiro, Niterói, Guapimirim, São Gonçalo, Duque de Caxias, Belford Roxo, Itaboraí, Nova Iguaçu, Maricá, Queimados, São João do Meriti, Mesquita, Magé e Nilópolis, entre outros municípios, também já apresentavam suas primeiras notificações antes de 30 de março, último dia da quinta semana da epidemia.

Entre os municípios pertencentes ao espaço metropolitano de Belo Horizonte, Sete Lagoas, Nova Lima, Betim, Contagem, Sabará, Santa Luzia, Ribeirão das Neves, Esmeraldas e Sarzedo tiveram suas primeiras notificações ainda no mês de março de 2020.

Uma espécie de controle da hierarquia urbana parece se delinear, também, quando se avança para as capitais regionais representadas na Figura 2. Em Minas Gerais, Uberaba, Uberlândia, Divinópolis e Juiz de Fora tiveram seus primeiros casos de COVID-19 notificados entre a segunda e quarta semanas. Varginha e Pouso Alegre, por sua vez, entraram para esse rol na quinta semana.

No Estado de São Paulo, capitais regionais importantes também foram afetadas ainda no mês de março. São José dos Campos e Campinas apresentaram notificações na 4ª semana a partir do primeiro caso registrado no Brasil, ao passo que Piracicaba, Sorocaba e Santos tiveram casos na

semana seguinte. Em todos esses casos, os municípios do entorno tiveram notificações, usualmente, em datas posteriores.

Difusão da COVID-19 entre os municípios segundo Patamar Populacional

Para a análise da relação entre difusão da COVID-19 e os patamares populacionais dos municípios, optou-se por classes de até 20 mil (3.796 municípios), 50 mil (1.101), 100 mil (349), 500 mil (276), um milhão de habitantes (31) e acima (17 municípios), buscando-se agrupamentos segundo ordens de grandeza significativamente distintas, que possam encerrar dinâmicas urbanas e de integração específicas, o que, consequentemente, poderia interferir em seus graus de proximidade social extramunicipal. Dessa forma, a fração dos municípios assim classificados pode ser observada no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo número de habitantes em 2019



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em IBGE (2019) e COTA (2020)
Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados para os quais não há identificação dos municípios.

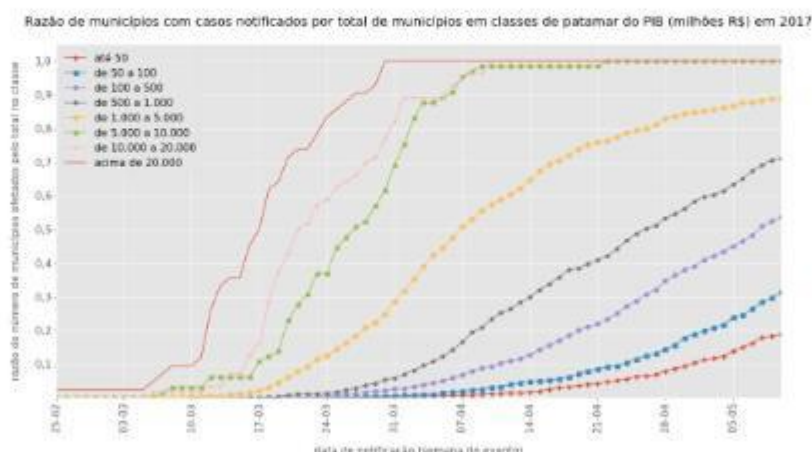
Por meio do Gráfico 3, é possível observar que os dois grupos de municípios com número de habitantes a partir de 500 mil tiveram uma vertiginosa participação, de maneira que, no intervalo de aproximadamente um mês, nenhum desses 48 municípios se ausentavam de notificação. Houve destaque também entre os municípios com população entre 100 mil e menos de 500 mil habitantes (276 municípios), que foram todos afetados no intervalo de dois meses. Quase todos os 349 municípios com população entre 50 e 100 mil habitantes foram afetados, o que levou, porém, todo o período analisado para ocorrer. Durante o período, foram afetados pela epidemia aproximadamente 78,8% dos 1.101 municípios com população superior a 20 mil e até 50 mil habitantes. Já os 3.796 municípios com população inferior a 20 mil habitantes tiveram um período de baixa suscetibilidade às notificações até 05 de abril. Desde então houve uma notável aceleração de sua participação entre aqueles com contaminações, chegando em 10 de maio a 1.374 municípios (37,3%).

Difusão da COVID-19 entre os municípios segundo Nível de Produção de Riqueza

Tendo em vista a necessidade de avaliação da difusão da COVID-19 entre municípios brasileiros, segundo classes de produção de riqueza, foi elaborado o Gráfico 4, em que é possível observá-los agrupados em seis faixas de PIB: até R\$ 50 milhões (693 municípios); mais de R\$ 50 a R\$ 100 milhões (1.109); mais de R\$ 100 a R\$ 500 milhões (2.447), mais de R\$ 500 milhões a R\$ 1 bilhão (561); acima de R\$ 1 a R\$ 5 bilhões (597); acima de R\$ 5 a R\$ 10 bilhões (65); acima de R\$ 10 a R\$ 20 bilhões (56); acima de R\$ 20 bilhões (42).

Essas classes foram criadas considerando a manutenção de intervalos de grandeza suficientes para caracterizar uma mudança relevante de produção de riqueza entre classes e de maneira a garantir uma mínima representatividade de municípios em seu interior.

Gráfico 4 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo PIB (R\$ milhões) em 2017



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em IBGE (2017) e COTA (2020)
Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

Pelo Gráfico 4, nota-se que as três primeiras classes, cujos municípios apresentam PIB acima de R\$ 5 bilhões, tiveram ritmo de exposição, segundo casos notificáveis, muito superior às demais, sendo aquela que tinha 100% de seus municípios afetados (163) até 11 de maio de 2020. Os 597 municípios com PIB entre 1 e 5 bilhões de reais foram atingidos significativamente, de maneira que 89,6% deles já apresentavam casos até aquela data. As quatro classes municipais restantes mantiveram esse padrão de menor proporção de municípios afetados no final do período analisado.

Assim, como as medidas de hierarquia urbana e de população parecem ter uma forte relação com o processo de difusão das primeiras notificações de COVID-19 entre os municípios brasileiros, vê-se que existe também uma relação importante com o PIB municipal. Para identificar se esse comportamento persiste em relação ao volume de riqueza produzido e normalizado por número de habitantes, os municípios brasileiros foram agrupados em classes de PIB *per capita*, expostas no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo PIB *per capita* em 2017 (R\$)



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em IBGE (2017; 2019) e COTA (2020)

Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

Dos 5.570 municípios brasileiros, 1.541 tinham PIB *per capita* de até R\$ 10 mil; 1.748 tinham acima de R\$ 10 a R\$ 20 mil, 1.126 de R\$ 20 a R\$ 30 mil, 594 com mais de R\$ 30 a R\$ 40 mil, 277 com mais de R\$ 40 a R\$ 50 mil, 271 com mais de R\$ 50 a R\$ 100 mil e, por fim, 58 municípios com PIB *per capita* acima dos R\$ 100 mil.

Nota-se que essa relação da difusão da COVID-19 com o nível de riqueza parece estar mais ligada ao volume bruto, uma vez que a diferença de exposição das populações nos municípios em diferentes classes de PIB *per capita* não se mostra tão distinta ao longo do tempo, conforme mostra o Gráfico 5.

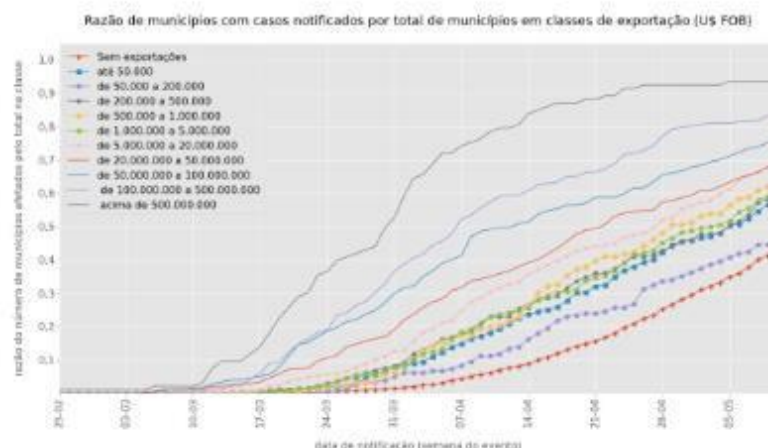
Difusão da COVID-19 entre os municípios segundo Volume de Exportações e Importações

Dado que parte significativa do trânsito de mercadorias pode servir como fator de mobilidade de pessoas entre os municípios, gerando proximidade social extramunicipal e exposição da população municipal ao SARS-CoV-2, o ritmo de difusão da COVID-19 entre municípios foi analisado em relação aos volumes de exportações e de importações.

É preciso destacar que a distribuição das exportações no Brasil é bastante desigual. No ano de 2019, 3.374 municípios não apresentavam qualquer volume exportado; 274, até US\$ 50 mil; 179, entre US\$ 50 e US\$ 200 mil; 161, entre US\$ 200 e US\$ 500 mil; 177, entre US\$ 500 mil e US\$ 1 milhão; 344, entre 1 e US\$ 5 milhões; 347, entre 5 e US\$ 20 milhões; 237, entre 20 e US\$ 50 milhões; 177, entre 50 e US\$ 100 milhões; 232, entre 100 e US\$ 500 milhões; 93 acima de US\$ 500 milhões. A proporção de municípios afetados nessas classes, por data de notificação, encontra-se no

Gráfico 6.

Gráfico 6 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo volume de exportações em 2019 (US\$ FOB)



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em MDIC (2020) e COTA (2020)

Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

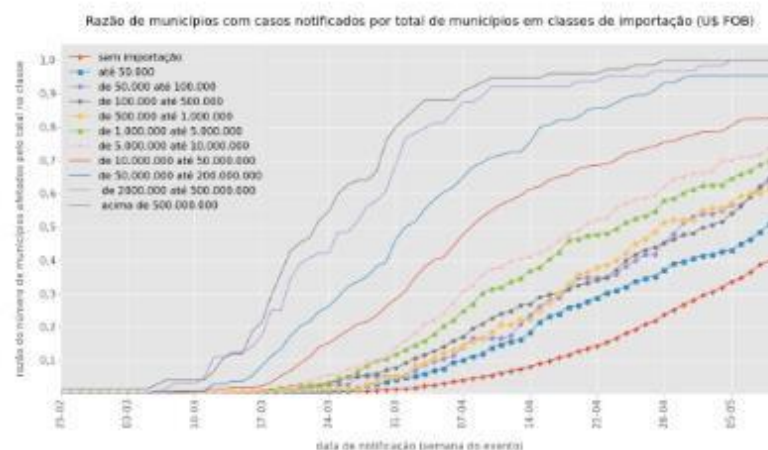
Novamente um padrão hierárquico é notável no processo de difusão da COVID-19 entre os municípios brasileiros, com destaque para os quase cem municípios com exportação superior a R\$ 500 milhões, atingidos em 93,6%, com decréscimo gradual de participação relativa intraclasses, até aquela sem exportação, que contou com 43,7% dos seus municípios (1.475 municípios) afetados, considerando-se a data de referência.

No que tange às importações, foram criadas as seguintes classes: sem importação (3.548 municípios); até US\$ 50.000 (420), acima de 50.000 até US\$ 100.000 (115); acima de 100.000 até US\$ 500.000 (283), acima de 500.000 até US\$ 1.000.000 (140); acima de 1.000.000 até US\$ 5.000.000 (364), acima de 5.000.000 até US\$ 10.000.000 (163); acima de 10.000.000 até US\$ 50.000.000 (26);

acima de 50.000.000 até US\$ 200.000.000 (134); acima de 200.000.000 até US\$ 500.000.000 (64); acima de US\$ 500.000.000 (75), apresentadas no Gráfico 7.

O Gráfico 7 mostra como as classes acima de US\$ 200 milhões em importação tiveram mais de 100% de seus 139 municípios afetados pela COVID-19 até a data de referência, seguidos pela classe imediatamente inferior (entre 50 e US\$ 200 milhões), com quase 95,5% de municípios (128 de 134) afetados e pela classe de 10 a US\$ 50 milhões, com 84,4% de municípios com registros de COVID-19 (223 de 264).

Gráfico 7 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo volume de importações em 2019 (US\$ FOB)



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em MDIC (2020) e COTA (2020)

Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

A difusão da epidemia teve um grande processo de aceleração em direção aos municípios das demais classes de importação, sobretudo a partir do final de março de 2020, avançando, inclusive sobre aqueles sem registro de importação. Ante o exposto, no que tange às exportações e importações, é importante notar que a presença da primeira contaminação apresenta contato com fatores exógenos ao respectivo município, pode ter alguma dependência do papel que os profissionais encarregados no trânsito de produtos podem exercer como vetores, de maneira que os distintos volumes de trânsito possam ter incorrido em variação da exposição dos municípios à primeira contaminação, ou, ainda, pode ser um fator relevante nos meses subsequentes ao período levantado. Reitera-se que as medidas de importação ou exportação, no entanto, têm limitações, pois não indicam mobilidade de cargas em transações internas.

Difusão da COVID-19 entre os municípios segundo Medidas Aeroviárias, Hidroviárias e Rodoviárias

Enquanto as medidas de exportação e importação não necessariamente se encontram diretamente ligadas à mobilidade de pessoas, visto que o aumento do volume de carga pode não corresponder a um aumento proporcional de pessoas que as conduzem, é adequado que sejam analisados dados de mobilidade de pessoas por meios aeroviário, hidroviário e rodoviário, uma vez que esses podem auxiliar a identificar as áreas em que existe maior risco de chegada da COVID-19 no contexto local, a partir de pessoas em trânsito nos aeroportos, nas rodoviárias e nos portos.

Como *proxy* do volume de pessoas em movimento nas rodoviárias e portos hidroviários, foi utilizado o índice de proximidade rodoviária/hidroviária (IBGE, 2016). No Brasil são 184 municípios com índice 0; 183 com índice de até 0,2; 1.382 municípios com índice entre 0,2 e 0,25; 2.285 municípios com índice entre 0,25 e 0,30; 1.332 municípios com índice entre 0,30 e 0,35; 189 com índice entre 0,4 e 0,5 e, por fim, 15 municípios com índice superior a 0,45. Para fins de entendimento do índice, cabe observar que São Paulo detém o maior, 0,56, o que significa que a capital paulista tem ligações de transporte

de passageiros com 56% dos nós da rede rodoviária do país (no caso dos municípios portuários ou de transporte intermunicipal via rios, como no Norte do país, esse indicador também se refere às ligações hidroviárias).

No Gráfico 8, observa-se que grupos de municípios com índice de proximidade mais elevado tendem a ter maior proporção interna de municípios afetados. Os 15 municípios com índice de proximidade acima de 0,45 se encontravam todos afetados pela COVID-19 ainda no mês de março. O grupo formado por aqueles em que o índice de proximidade era de 0,40 a 0,45, contou com mais de 90% de seus 189 municípios afetados por COVID-19 (171 municípios) no último dia em análise. Dos 1.332 municípios com índices de proximidade entre 0,35 e 0,40, 864 (65,6%) haviam sido afetados pela epidemia até o limite do período investigado.

Gráfico 8 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo índice de proximidade



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em IBGE (2016) e COTA (2020)

Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

Os grupos com menores níveis de proximidade apresentaram, de maneira geral, uma proporção menor dos seus municípios com casos confirmados, até a data limite do presente estudo, mas sem que fosse detectável uma relação linear entre diminuição do nível de proximidade na classe e a proporção de municípios afetados. Isso ocorre por conta de algumas particularidades das medidas de proximidade rodoviária. Na classe de municípios sem ligação rodoviária, por exemplo, vinte e nove dos oitenta e três municípios sem ligação rodoviária direta (índice 0) que apresentaram casos de COVID-19 estão ligados a metrópoles ou capitais regionais, de maneira que, embora não contem com sua própria rodoviária, encontram-se em áreas metropolitanas ou centralidades intermediárias servidas por elas.

Seguindo-se com a análise da relação entre o fluxo de pessoas e a difusão da epidemia, é possível analisar dados de número de passageiros em voos nacionais e internacionais, conforme apresenta o Gráfico 9.

Assim, para fins da presente pesquisa, no Brasil, somente vinte e cinco municípios contavam com voos internacionais, que, de maneira geral, fizeram parte das primeiras levadas de municípios afetados, como é possível se observar no Gráfico 9. Dada a origem externa da COVID-19, é inegável o papel dos voos internacionais para a disseminação dos primeiros casos no país. De fato, todos os dezesseis municípios cujos aeroportos recebem mais de 20.000 passageiros internacionais por ano foram atingidos em menos de um mês do início do evento epidêmico.

Gráfico 9 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo classe de passageiros em voos internacionais



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em ANAC (2020) e COTA (2020)

Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

O rol de municípios com voos domésticos é maior, com 159 no ano de 2019. Todos os dezenove municípios com trânsito de mais de 1 milhão de passageiros por ano foram atingidos até 20 de março. Na sequência, os trinta e um com trânsito de passageiros na ordem das centenas de milhares até um milhão foram atingidos até 08 de abril. As demais classes de municípios, conforme número de passageiros nacionais, também se destacam do comportamento daqueles municípios sem aeroportos – Gráfico 10.

Gráfico 10 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo classe de passageiros em voos nacionais



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em ANAC (2020) e COTA (2020)

Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

Nota-se que as medidas de proximidade rodoviária-hidroviária e as de número de passageiros em voos internacionais ou domésticos apresentam uma grande relação com o processo de difusão da COVID-19 entre municípios brasileiros. É possível que medidas de restrição à mobilidade das

empresas de transporte rodoviário e hidroviário tomadas no Brasil tenham surtido algum efeito no processo de difusão municipal da COVID-19. Ainda assim, o monitoramento futuro desses indicadores pode ser relevante, sobretudo em momentos de relaxamento das estratégias de distanciamento/isolamento social.

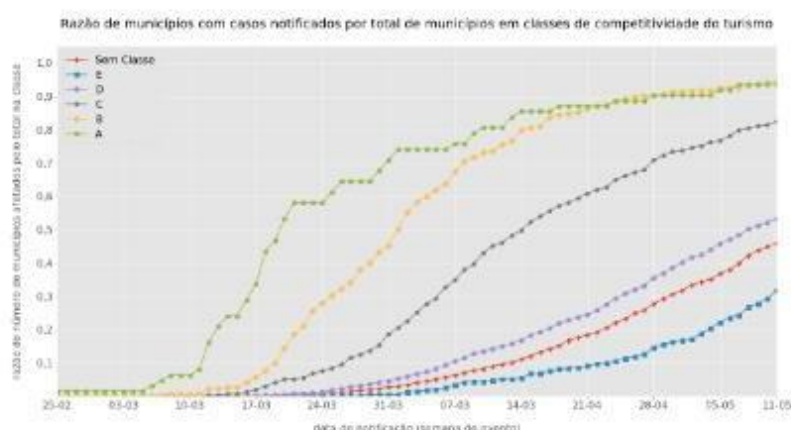
Difusão da COVID-19 entre os municípios segundo Classes de Relevância do Turismo

O turismo, por sua intrínseca ligação com a mobilidade de pessoas, seja para fins de lazer ou negócios, seguramente tem um efeito importante na forma como ocorre a difusão territorial de uma epidemia da COVID-19. Por essa razão, adiante é apresentada a relação entre classes de municípios segundo competitividade para o turismo e a evolução das notificações de COVID-19.

No ano de 2019, 2.694 municípios com alguma participação no setor de turismo foram classificados segundo níveis de relevância, enquanto os 2.876 municípios restantes não apresentaram participação notável a ponto de entrarem no estudo do Ministério do Turismo (2019). A classe A, a mais alta, tinha 62 municípios; a B, 257; a C, 475; a D, 1522; e a E, 377.

O Gráfico 11 mostra que é muito alta a correlação entre as classes de turismo e a proporção de municípios afetados pela COVID-19, no período em análise, em que pese o fato de os municípios sem classificação terem maior participação tanto relativa como absoluta, quando comparados com os municípios de classe de competitividade E.

Gráfico 11 – Razão de municípios com casos notificados por total de municípios no Brasil, segundo classes de relevância do Turismo



Fonte: Elaborado por Augusto dos Santos Pereira a partir de dados disponíveis em MINISTÉRIO DO TURISMO (2019) e COTA (2020)

Nota: O gráfico ignora uma minoria de casos reportados nos quais não há identificação dos municípios.

Ressalta-se que o turismo é um indicador que aponta para a relevância de um acompanhamento de diferentes fatores no monitoramento da difusão territorial da COVID-19. Isso porque, ao mesmo tempo que aponta para os mesmos casos já identificados por outras medidas (como População, PIB e hierarquia urbana), destacando-se como elevados os casos de São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador entre outros, também aponta para a relevância de municípios não evidenciados por aqueles indicadores. Assim, os municípios como Ilha Bela (SP), Porto Seguro (BA) e Caldas Novas (GO), entre outros, que não se encontram no topo de qualquer outra medida levantada até agora, apresentam no turismo um elemento relevante, por comporem índice A de competitividade. É razoável reconhecer, portanto, que as medidas sobre turismo, conjugadas a outras, conformam indicadores importantes para a categorização dos municípios com maior suscetibilidade à apresentação/ocorrência de casos de COVID-19.

Classes de Municípios Segundo Grau de Exposição ao Risco Decorrente de Proximidade Social Extramunicipal

No período avaliado, os dados apontam para uma difusão com ritmos distintos da epidemia entre os municípios, de maneira que alguns grupos podem ser identificados. O primeiro deles, é um grupo de municípios com elevada exposição ao risco de inserção do vírus no contexto comunitário, visto que contou com substantivo número de municípios com casos já no primeiro mês da difusão. Esses municípios apresentam uma ou mais das seguintes características: elevada ou intermediária hierarquia urbana (polos metropolitanos e integrantes dos espaços metropolitanos, bem como capitais regionais ou até centros sub-regionais); com população a partir de 500 mil habitantes; com PIB a partir de R\$ 5 bilhões; ou com importações acima de R\$ 200 milhões; com índice de proximidade rodoviária/hidroviária acima de 0,45; acima de 20.000 passageiros por ano em voos internacionais de seus aeroportos; acima de 100.000 passageiros em voos domésticos; classe A de competitividade do turismo.

Outro grupo identificável é formado por municípios cuja participação relativa entre aqueles com casos de COVID-19 cresceu significativamente a partir do vigésimo dia da primeira notificação no país. Esses municípios apresentam as seguintes características, não necessariamente concomitantes: centros de zona A ou centros sub-regionais B; municípios com mais de 50 mil até 500 mil habitantes; PIB entre R\$ 1 e R\$ 5 bilhões, importações entre R\$ 10 e R\$ 200 milhões; índice de proximidade entre 0,4 e 0,45; até 20.000 passageiros em voos internacionais; acima de 10.000 até 100.000 passageiros em voos domésticos; classe B de turismo.

Um terceiro grupo é formado por centros de zona B; população entre 20.000 e 50.000 habitantes; entre R\$ 500 milhões e R\$ 1,0 bilhão de PIB; importações entre R\$ 50 mil até R\$ 10 milhões; classe de proximidade abaixo de 0,4 – abaixo desse limiar, não se evidencia um padrão claro para delimitação de grupos de municípios com diferentes níveis de suscetibilidade, por essa razão, as duas classes de menor suscetibilidade apresentadas não são diferenciadas por esse parâmetro; com aeroporto em que circulam até 10 mil passageiros em voos domésticos, mas sem viagens internacionais de passageiros; nível C de competitividade de turismo C.

Por fim, os municípios que tiveram menor suscetibilidade relativa ao longo do período, foram aqueles com: hierarquia urbana de centro local; PIB abaixo de R\$ 500 milhões, sem importações ou com importações com valor de até R\$ 50 mil em 2019, sem aeroporto com viagens internacionais ou nacionais; competitividade de turismo D ou sem ranqueamento no tema.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou entender de que forma fatores de proximidade social extramunicipal condicionam o grau de exposição das populações nos diferentes municípios brasileiros ao risco de contaminação por SARS-CoV-2. Para tanto, baseou-se em matriz teórica que considera que condições sociais, ambientais e etiológicas, combinadamente, conformam fatores explicativos das difusões de doenças infectocontagiosas, o que reafirma a importância do conceito de espaço geográfico na análise de difusão desse tipo de doenças, em geral, e da COVID-19, especificamente. Nesse interim, considerando-se as evidências da proximidade social como fator relevante em sua disseminação, foram buscados dados sobre fatores de proximidade social extramunicipal, ou seja, de elementos que indiquem que indivíduos pertencentes à população de determinado município tenham maior probabilidade de interação com indivíduos não-residentes, com origens em outros municípios ou mesmo no exterior. Os dados escolhidos (hierarquia urbana, patamar populacional, produção de riqueza, trânsito de mercadorias, transporte de passageiros e turismo) foram comparados com aqueles de data notificação do primeiro caso em cada município brasileiro.

Os resultados mostram que, com diferentes intensidades, esses fatores de proximidade social extramunicipal estão associados a diferentes graus de exposição das populações nos municípios ao risco de introdução de SARS-CoV-2 ao longo do tempo. Em cada município, os primeiros casos podem resultar da exposição à contaminação, o que resulta de diversas dinâmicas sociais: trânsito de turistas, pessoas de classe média, que estão voltando de férias alhures, caminhoneiros com mercadorias em trânsito etc. Não há como identificar qual a participação de cada um desses fatores na efetiva chegada dos primeiros casos entre residentes nos municípios. Por essa razão, as medidas de hierarquia urbana, de concentrações populacional e econômica, de integração por fluxos de pessoas e de atração para o turismo apresentadas parecem servir como identificação de distintos patamares de participação dos municípios nos fluxos intermunicipais, regionais, nacionais e globais,

que, em suas crescentes escalas de grandeza, relacionam-se com um menor ou maior grau de exposição da população à introdução local do vírus.

Em meio a um contexto de crescente integração territorial, para além dos eixos mais dinâmicos do Centro-Sul, a difusão geográfica da COVID-19 no Brasil se mostra como um fenômeno com potencial para alcançar todos os municípios do país. O processo ocorre, porém, com suas particularidades, de forma que a difusão se dá por uma espécie de distância topológica, em que fatores de integração e mobilidade populacional, níveis de centralidade, trânsito de pessoas para transporte de produtos, concentração populacional e econômica, bem como destaque nos serviços de turismo criam condições para maior risco à manifestação da doença dentro dos territórios municipais de destaque, a partir dos quais se disseminam para os municípios de seu entorno mais próximo, em que a lógica topológica se associa à proximidade euclidiana e ao avizinhamento.

Esse tipo de medida em fração de grupos de municípios atingidos e as cinco classes municipais obtidas podem servir para a elaboração de índice de suscetibilidade municipal a contaminações externas por COVID-19, representando um dado de probabilidade variável no tempo.

É possível que o papel de diversos desses fatores aqui levantados tenham comportamentos distintos ao longo do tempo, de maneira que, em um primeiro momento, a mobilidade de passageiros internacionais, sobretudo em cruzeiros e aeroportos, tenha tido maior relevância na difusão da epidemia nas primeiras semanas, enquanto outras mobilidades (de prestadores de serviços de entrega, de viajantes em transporte rodoviário, hidroviário e aeroviário de passageiros domésticos) passem a ter maior relevância ao longo do tempo, o que torna o monitoramento da expansão da epidemia em face das métricas aqui apresentadas um procedimento viável de subsídio às políticas de contenção, às estratégias de distanciamento/isolamento social e às futuras fases de abertura.

Outros indicadores não adotados no presente trabalho podem contribuir para melhores resultados explicativos e para o monitoramento. Em lugar do PIB *per capita*, por exemplo, a renda média das famílias pode ser um elemento de elevada importância, uma vez que os primeiros casos tiveram muita associação com viajantes internacionais, mais comuns entre os extratos socioeconômicos mais altos. Da mesma forma, os estudos sobre aglomerados populacionais podem ajudar a identificar classes de municípios com maior integração por pendularidade populacional, que, porventura, comonhem distintos níveis de suscetibilidade.

Cabe destacar que, ao menos com os dados considerados, os cinco grupos resultantes dificilmente poderiam ser operacionalizados a contento por técnicas tradicionais de análise de *clusters*, ou exigiriam procedimentos bastante custosos de engenharia de atributos – *feature engineering* –, uma vez que muitos municípios com características significativamente diferentes foram atingidos a cada semana do evento epidêmico, o que seria tomado como “ruído” por esses modelos. Dessa forma, o procedimento aqui adotado, pela avaliação da relação de cada fator com o ritmo de exposição relativa dos municípios aos primeiros casos notificados, parece contornar esse tipo de limitação.

REFERÊNCIAS

- ANAC. Agência Nacional De Aviação Civil. **Dados e Estatísticas**. Brasília: ANAC, 2020. Disponível em: <https://www.anac.gov.br/assuntos/dados-e-estatisticas>. Acesso em: 26 mar. 2020.
- BARRASA, H.; RELLO, J.; TEJADA, S.; MARTÍN, A.; BALZISKUETA, G.; VINUESA, C.; FERNÁNDEZ-MIRET, B.; VILLAGRA, A.; VALLEJO, A.; SAN SEBASTIÁN, A.; CABAÑES, S.; IRIBARREN, S.; FONSECA, F.; MAYNAR, J., ALAVA COVID-19 STUDY INVESTIGATORS (2020). SARS-CoV-2 in Spanish Intensive Care Units: Early experience with 15-day survival in Vitoria. *Anaesthesia Critical Care and Pain Medicine*, [S. l.], p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.accpm.2020.04.001>
- BBC NEWS. **Coronavirus: Hard-hit Brazil removes data amid rising death toll**. Disponível em: <https://www.bbc.com/news/world-latin-america-52952686>. Acesso em: 20 jun. 2020.
- BERRY, B. J. L.; GARRISON, W. L. The Functional Bases of the Central Place Hierarchy. *Economic Geography*, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 145–154, 1958. DOI: 10.2307/142299. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2307/142299>. Acesso em: 20 dez. 2017. <https://doi.org/10.2307/142299>
- BULUT, C.; KATO, Y. Epidemiology of covid-19. *Turkish Journal of Medical Sciences*, [S. l.], v. 50, n. SI-1, p. 563–570, 2020. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-172>

CHRISTALLER, W. *Die zentralen Orte in Suddeutschland*. Jena: Gustav Fischer, 1933.

COSSARIZZA, A.; DE BIASI, S.; GUARALDI, G.; GIRARDIS, M.; MUSSINI, C.; MODENA COVID-19 WORKING GROUP (MOCO19). SARS-CoV-2, the Virus that Causes COVID-19: Cytometry and the New Challenge for Global Health. *Cytometry, Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2020. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24002>

COTA, W. **Número de casos confirmados de COVID-19 no Brasil**. Viçosa: UFV, 2020. Disponível em: <https://labs.wesleycota.com/sarscov2/br/#municipio>. Acesso em: 27 mar. 2020.

ECDC. European Center for Disease Prevention and Control. **Situation update worldwide**. Estocolmo: ECDC, 2020. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>. Acesso em: 25 abr. 2020.

GE, H.; WANG, X.; YUAN, X.; XIAO, G.; WANG, C.; DENG, T.; YUAN, Q.; XIAO, X. The epidemiology and clinical information about COVID-19. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 1011–1019, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03874-z>

HUANG, X.; WEI, F.; HU, L.; WEN, L.; CHEN, K. Epidemiology and Clinical Characteristics of COVID-19. *Archives of Iranian medicine*, Iran, v. 23, n. 4, p. 268–271, 2020. <https://doi.org/10.34172/aim.2020.09>

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Tabela 5938 - Produto interno bruto a preços correntes**. Rio de Janeiro: IBGE/CDDI, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5938>. Acesso em: 27 mar. 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativas da População – Estima Pop**. Rio de Janeiro: IBGE/CDDI, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/estimapop/tabelas>. Acesso em: 27 mar. 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Malhas Municipais**. Rio de Janeiro: IBGE/DEGEO, 2018. Disponível em: ftp://geoftp.ibge.gov.br/organizacao_do_territorio/malhas_territoriais/malhas_municipais/. Acesso em: 27 mar. 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **REGIC – Pesquisa de Ligações rodoviárias e hidroviárias**. Rio de Janeiro: IBGE/CDDI, 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2100617>. Acesso em: 27 mar. 2020.

INFOGRIPE. **Situação da gripe**. Rio de Janeiro: FioCruz, 2020. Disponível em: <http://info.gripe.fiocruz.br/>. Acesso em: 24 mai. 2020.

HEROY, S. Metropolitan-scale COVID-19 outbreaks: how similar are they? [S. l.], 2020. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/2004.01248>. Acesso em: 22 jun. 2020.

JUNQUEIRA, R. D. Geografia Médica E Geografia Da Saúde. *HYGEIA, Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 1–10, 2009.

LANA, R. M.; COELHO, F. C.; COSTA GOMES, M. F.; CRUZ, O. G.; BASTOS, L. S.; VILLELA, D. M. The novel coronavirus (SARS-CoV-2) emergency and the role of timely and effective national health surveillance. *Cadernos de saúde pública*, Brazil, v. 36, n. 3, p. e00019620, 2020. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00019620>

LEMONS, J. C. INSTITUTO, Prof. UFU, De Geografia. a Geografia Médica E As Doenças Infecto-Parasitárias. *Medicina*, [S. l.], p. 74–86, 2002.

LEWERNARD, J. A.; LO, N. C. Scientific and ethical basis for social-distancing interventions against COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 20, n. 6, p. 631–633, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30190-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32213329/>. Acesso em: 22 jun. 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30190-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30190-0)

LIU, T.; HU, J.; KANG, M.; LIN, L.; ZHONG, H.; XIAO, J.; HE, G.; SONG, T.; HUANG, Q.; RONG, Z.; DENG, A.; ZENG, D.; TAN, X.; ZENG, S.; ZHU, Z.; LI, J.; WAN, D.; LU, J.; DENG, H.; HE, D.; MA, W. Transmission dynamics of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *bioRxiv*, [S. l.], p. 2020.01.25.919787, 2020. DOI: 10.1101/2020.01.25.919787. Disponível em:



Mast Cells in Alveolar Septa of COVID-19 Patients: A Pathogenic Pathway That May Link Interstitial Edema to Immunothrombosis

Jarbas da Silva Motta Junior^{1,2}, Anna Flavia Ribeiro dos Santos Miggiolaro^{1,2}, Seigo Nagashima¹, Caroline Busatta Vaz de Paula¹, Cristina Pellegrino Baena^{1,2*}, Julio Scharfstein³ and Lucia de Noronha¹

¹ School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR, Curitiba, Brazil, ² Hospital Marcelino Champagnat, Curitiba, Brazil, ³ Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Jean Sylvia Marshall,
Dalhousie University, Canada

Reviewed by:

Theodoris Constantin Theodoridis,
Tufts University School of Medicine,
United States
Paige Lacy,
University of Alberta, Canada
Zhongshan Cheng,
St. Jude Children's Research Hospital,
United States
Jenny Hallgren,
Uppsala University, Sweden

*Correspondence:

Cristina Pellegrino Baena
cristina.baena@pucpr.br

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 22 June 2020

Accepted: 27 August 2020

Published: 18 September 2020

Citation:

Motta Junior JdS, Miggiolaro AFdS,
Nagashima S, de Paula CBV,
Baena CP, Scharfstein J and de
Noronha L (2020) Mast Cells in
Alveolar Septa of COVID-19 Patients:
A Pathogenic Pathway That May Link
Interstitial Edema to
Immunothrombosis.
Front. Immunol. 11:574862.
doi: 10.3389/fimmu.2020.574862

It is currently believed that innate immunity is unable to prevent the spread of SARS-CoV-2 from the upper airways to the alveoli of high-risk groups of patients. SARS-CoV-2 replication in ACE-2-expressing pneumocytes can drive the diffuse alveolar injury through the cytokine storm and immunothrombosis by upregulating the transcription of chemokine/cytokines, unlike several other respiratory viruses. Here we report histopathology data obtained in post-mortem lung biopsies of COVID-19, showing the increased density of perivascular and septal mast cells (MCs) and IL-4-expressing cells ($n = 6$), in contrast to the numbers found in pandemic H1N1-induced pneumonia ($n = 10$) or Control specimens ($n = 10$). Noteworthy, COVID-19 lung biopsies showed a higher density of CD117⁺ cells, suggesting that c-kit positive MCs progenitors were recruited earlier to the alveolar septa. These findings suggest that MC proliferation/differentiation in the alveolar septa might be harnessed by the shift toward IL-4 expression in the inflamed alveolar septa. Future studies may clarify whether the fibrin-dependent generation of the hyaline membrane, processes that require the diffusion of procoagulative plasma factors into the alveolar lumen and the endothelial dysfunction, are preceded by MC-driven formation of interstitial edema in the alveolar septa.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID 19, mast cells (MC), cell-mediated immunity, immune responses, interleukin-4 (IL-4)

INTRODUCTION

As the pandemic caused by SARS-CoV-2 spreads to developing countries, the number of patients requiring intensive care treatment in overcrowded hospitals keeps increasing, limiting the clinical staff's capacity to prevent fatal outcomes. Viewed from the clinical perspective, the aims are to ameliorate respiratory functions by reducing the diffuse alveolar damage (DAD) that causes acute respiratory distress syndrome (ARDS) and to prevent the systemic thrombosis and multiple organ failure (1).

Although the temporal link between inflammatory edema and intra-alveolar hyaline membranes is yet to be proven, it has been established that infected pneumocytes undergoing apoptosis induce

an inflammatory response conducting to interstitial edema and the consequent influx of plasma-borne procoagulative factor accumulating in interstitial spaces. The procoagulative factor-rich interstitial edema so would leak through intra-alveolar spaces triggering fibrin deposition over the damage alveolar septa (hyaline membranes). Converging with these infection-associated inflammatory lesions, patients afflicted with severe COVID-19 DAD mount a systemic immunothrombosis response that is steered by hyper-activated leukocytes. Particularly sensitive to microthrombi deposition, the alveolar capillaries are eventually clogged with thrombi, further disabling oxygen transfer to the bloodstream (2, 3).

Strategically localized in the subendothelial region, mast cells (MCs) are specialized innate sentinel cells that, upon activation, induce microvascular leakage, thereby linking immunity to pro-inflammatory and procoagulative networks as complement and the contact/kallikrein-kinin system (4–6). Despite evidence that MCs sense RNA viruses via TLR7 (7), MC-dependent increases in microvascular permeability might be potentiated by a myriad of soluble inflammatory mediators, including complement anaphylatoxins and tissue-derived alarmins (7, 8). Although MC targeting by cromolyn inevitably comes to mind as a low-cost therapeutic option, it has been reported that traditional MC stabilizers are far less potent inhibitors of MC release of inflammatory mediator than luteolin analogs, recently recognized as alternative drug therapy in corona-virus infection (8, 9).

The current study was partly motivated by a recent report showing the transcriptional profile of epithelial cells infected by SARS-CoV-2 vs. other human respiratory viruses (10). In contrast to the phenotypic properties of other viruses, the antagonism of (anti-viral) type-I and type III interferons are associated with a robust increase in the transcriptional program of chemokines/cytokines in SARS-CoV-2-infected epithelial cells. At first sight, these results raise the possibility that specific subsets of leukocytes (or their progenitors) might be recruited to the inflamed lung via upregulated secretion of specific chemokines. Although the dynamics of leukocyte recruitment to the alveolar septum of COVID-19 are unknown, we reasoned that some of the pathological features associated with severe COVID-19 could result from MC recruitment and/or maturation. Following this reasoning, we sought to compare the immunopathological aspects described in COVID-19 with knowledge already acquired in other respiratory viral pandemics, such as the pandemic Influenza A virus H1N1 subtype (H1N1pdm09) (11).

STUDY DESIGN AND POST-MORTEM RESULTS

Post-mortem Samples and Methods

The present study was approved by the National Research Ethics Committee (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa—CONEP), protocol number 3.944.734/2020 (COVID-19 patients), and 2.550.445/2018 (H1N1pdm09 and Control patients). All methods were carried out following relevant guidelines and regulations.

Families permitted the post-mortem biopsy of the cases of COVID-19 and H1N1pdm09.

We performed a histopathological study to compare the distribution of MCs in post-mortem lung biopsies of patients with COVID-19 (COVID-19 Group, $n = 6$, positive nasal swab RT-PCR for SARS-CoV-2 confirmed in more than one test) and post-mortem biopsies from patients with H1N1pdm09 infection (Group H1N1, $n = 10$, positive RT-PCR in fresh lung samples). Also included in this study was a Control group of lung samples ($n = 10$) from patients who died from neoplastic or cardiovascular diseases.

Clinical data were obtained from medical records during hospitalization in the Intensive Care Unit (ICU). A minimally invasive lung post-mortem biopsy was performed through a left anterior mini-thoracotomy with upper left lobe segment resection. The area's selection followed two criteria; (i) area with more severe lung injury identified on tomography and (ii) preferably in the left lung due to the mini-thoracotomy technique. The resected pieces were up to 3×3 cm.

The lung samples provided by post-mortem biopsy were formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

As read-outs, MCs and progenitors were identified by immunohistochemistry (IHQ) using a polyclonal antibody anti-CD117 (c-kit polyclonal rabbit anti-human, Dako Agilent, A4502) staining on FFPE samples. The secondary polymer was Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, CA, USA. Specificity controls were performed by (i) omitting the primary antibody (negative control) and (ii) testing skin tissues with mastocytosis (positive controls for anti-CD117). MC and degranulation responses were identifying by the toluidine blue (TB) stain.

CD117⁺ (only nucleated cells) and MCs were scored (IHQ and TB) exclusively in the alveolar septa and perivascular spaces, by counting the positive cells per high-power field (HPF $40\times$ Olympus objective 0.26 mm^2). Average scores were obtained by screening 10 randomized HPFs (total area of 2.6 mm^2 per case).

The immunohistochemistry technique was also used to identify the expression of the interleukin-4 (anti-IL-4, Polyclonal/Rabbit, clone PA5-25165, dilution 1:200, Thermo Fisher). As stated for CD117 immunostaining, we used as secondary polymer Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, CA, USA, and positive and negative controls were performed.

The slides of IL-4 were scanned (Axio Scan Scanner, Z1, Carl Zeiss, Germany), and the ZEN software selected ten HPF ($40\times$ objective). The immunopositivity areas were measured by the Image-Pro Plus software version 4.5 (Media Cybernetics, USA). Subsequently, these areas were converted into percentages to enable statistical analysis.

The comparison of the quantitative variables of the two groups was performed using the non-parametric Kruskal Wallis test. Values of $p < 0.05$ indicated statistical significance. The data were analyzed using the IBM SPSS Statistics v.20.0 software. Armonk, NY: IBM Corp.

TABLE 1 | Comparison between COVID-19, H1N1, and Control groups according to clinical and histopathological findings.

Data	COVID-19 (N = 6)	H1N1 (N = 10)	CONTROL (N = 11)
Gender	Male 4 (66.6%) Female 2 (33.4%)	Male 8 (80.0%) Female 2 (20%)	Male 8 (72.7%) Female 3 (27.3%)
Age (years) ^a	76.5/80.5 (53–87)	43.5/44 (23–61) 0.551*	42.3/45 (18–60) 0.793*
Comorbidities (number of cases)	Hypertension (4/6) Dyslipidemia (1/6) Hypothyroidism (1/6) Class III obesity (2/6) Dementia (2/6) Diabetes Mellitus (1/6) Chronic Kidney Disease (2/6) Coronary Disease (2/6)	—	—
Time from hospitalization to death (days) ^a	12.8/10 (2–32)	4.70/1.5 (1–19) 0.006*	7.6/4 (1–48) 0.011*
Mechanical ventilation ^a	9.7/6 (0–21)	4.70/1.5 (1–19) 0.185*	—
IL-4 tissue expression ^{a,b}	8.26/9.37 (0.71–13.39)	0.54/0.41 (0.19–1.12) 0.003*	2.84/2.26 (0.23–7.41) 0.0509 ^c
Number of CD117 ⁺ cells ^{a,c}	8.93/11.25 (2.90–12.70)	1.03/0.65 (0.20–3.10) 0.002*	0.51/0.35 (0.10–1.40) 0.001*
Number of Mast cells (toluidine blue) ^{a,c}	1.58/1.35 (1.50–1.05)	0.09/0.10 (0.30–0.00) 0.001*	0.05/0.00 (0.20–0.00) 0.001*

^aAverage/Median (Min–Max).^bTissue expression in percentage per HPF.^cNumber of CD117⁺/MCs in 10 HPF (average).

*p-values obtained were compared between COVID-19 vs. H1N1.

^ap-values obtained were compared between COVID-19 and Control group. p-values were performed using the non-parametric Mann-Whitney test (p < 0.05).

Histopathological and Immunohistochemical Results

Clinical characteristics of the COVID-19, H1N1, and Control groups as age, survival (time from hospitalization to death), mechanical ventilation, tissue expression of IL-4, CD117⁺ cells, and MC score are listed in **Table 1**.

The COVID-19 group presented type 2 pneumocyte hyperplasia, hyaline membranes, and septal thickness with mild lymphocytic infiltration characterizing proliferative DAD. Furthermore, COVID-19 biopsies showed numerous fibrinous thrombi (**Figure 1**) following by neutrophilic endotheilitis. Signs of secondary bacterial pneumonia were not observed. Although the formation of hyaline membranes was also observed in H1N1 biopsies, the histopathological features of these patients were distinguished by a marked increase in septal thickness associated with lymphocytic infiltration and a massive intra-alveolar influx of neutrophils. There was no expressive neutrophilic endotheilitis in H1N1 cases. Signs of bacterial coinfection were found in 8 cases.

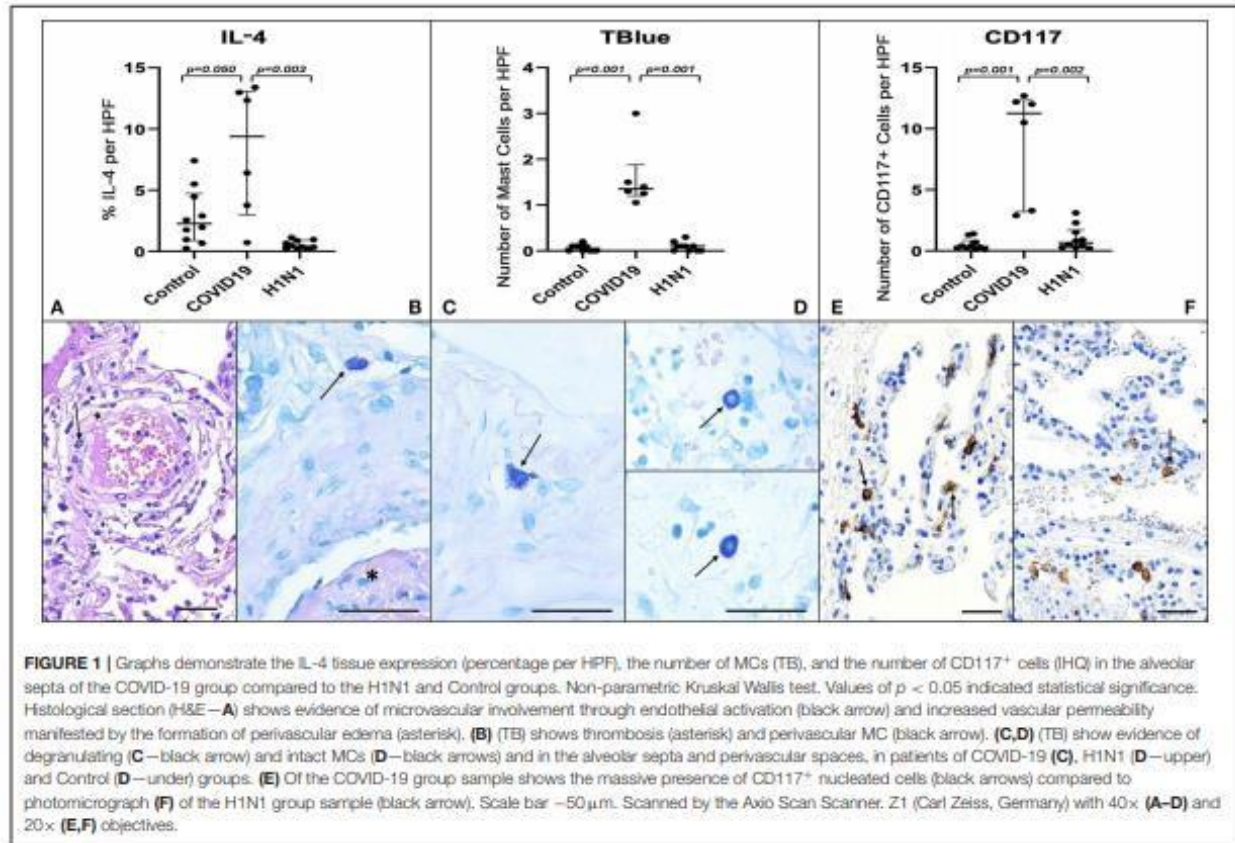
COVID-19 group samples presented numerous MCs. These innate sentinel cells were more frequently localized in the perivascular spaces between the alveolar sacs and terminal bronchioles and in the alveolar septa, close to the alveolar capillaries. The results presented in **Figure 1** and **Table 1** show the distribution of CD117⁺ cells (IHC) and MCs (TB) in post-mortem lung biopsies of patients with COVID-19 with a striking

difference in the number of CD117⁺ cells and MCs between the COVID-19 group and the H1N1 ($p = 0.002$ and 0.001 , respectively) and Control ($p = 0.001$ and 0.001 , respectively) groups. The number of MCs counted by the TB technique was about 5-fold lower than the number of CD117⁺ cells (IHC). MC degranulation (TB) was consistently seen in the alveolar septa of COVID-19, as well as TB⁺ individual granules (non-nucleated) dispersed in tissues and MCs with depleted cytoplasm (**Supplementary Figure 1**).

By morphological criteria, the pulmonary cells expressing IL-4 are mainly alveolar macrophages and type II pneumocytes in all three groups (**Supplementary Figure 1**). The COVID-19 group presents statistically significant higher tissue expression of IL-4 (**Table 1** and **Figure 1**) compared to H1N1 ($p = 0.003$) and Control groups ($p = 0.0509$, borderline).

DISCUSSION

Despite their functional heterogeneity, human MCs are known to produce a wide range of pro-inflammatory molecules, including distinct categories of mediators stored in secretory granules. Among those that modulate endothelial barrier function are classical vasoactive mediators, such as histamine, leukotriene B4 and LTC4, prostaglandin D2, vascular endothelial growth factor, serine proteases, such as tryptase and chymase. MCs also contribute to cytokine networking by releasing the type-2



cytokine IL-4 and IL-6, a pivotal player in the systemic cytokine storm associated with severe COVID-19 (12).

Although MC-derived histamine is a classical inducer of microvascular leakage, previous analysis of MC function in allergic lung disease (13) linked bradykinin-induced inflammation to extravascular activation of plasma-borne contact factors by heparin (14) and/or polyphosphates (15), both of which are released from MC secretory granules. We observed the presence of degranulated MCs in the alveolar septa, regardless of the nature of the inflammatory mediators released by infected epithelial cells. It is tempting to speculate that MC-driven microvascular leakage favors the intra-alveolar formation of the hyaline membrane by harnessing the diffusion of plasma procoagulative factors from the interstitial space into the alveolar sac.

Previous studies in mice infected by SARS-Cov supported the concept that ACE-2 (angiotensin-converting enzyme 2) internalization following virus entry in epithelial cells worsens lung inflammation by down-modulating the surface expression of ACE-2, a key regulator of the renin-angiotensin system (16). Although the anti-inflammatory effects of ACE-2 are usually attributed to its ability to degrade angiotensin II, studies in mice deficient of ACE-2 demonstrated that this metalloprotease dampens LPS-induced inflammation in the lung

by degrading des-Arg-bradykinin, i.e., the high-affinity ligand of B1R, a subtype of endothelial bradykinin receptors whose surface expression is strongly upregulated by pro-inflammatory cytokines (16, 17).

Multiple mechanisms, including complement components (e.g., C5a) (18) and inflammatory cytokines (e.g., TNF- α), can mediate MC activation. Among these, immunoglobulin E (IgE) is probably the best known. Regarding the endothelial injury triggering immunothrombosis, activated MCs can release pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-6) to induce matrix-degrading protease expression from endothelial cells, causing endothelial barrier injury. Activated MCs can also release proteases (e.g., tryptase) to induce vascular cell apoptosis, angiogenic factors to stimulate angiogenesis and histamine (19).

Another contrasting histopathological feature between COVID-19 and H1N1 described in our report was the increased numbers of IL4-expressing cells in the alveolar septa of patients with severe COVID 19. Classically produced by Th2 lymphocytes, IL-4 is a type-2 cytokine also secreted by MC, basophils, eosinophils, and innate lymphoid cells-2. Interestingly, longitudinal analysis of peripheral immune profiles of SARS-Cov-2 patients has recently revealed that cytokine signatures displayed by severe COVID-19 patients are shifted toward the type-2 cytokine profile. At the same time, type-1/3

responses are shared with the profiles of patients with moderate clinical manifestations (20). Although peripheral IL-4 responses were not as prominent as IL-5, IL-13, IgE, and eosinophils, the authors pointed out that severe clinical outcomes were associated with an upward trend for the IL-4 cytokine. Intriguingly, they also reported that levels of IgE levels were significantly higher in severe patients and continued to increase as the disease progressed.

IL-4 can impair endothelial barrier function by inducing cytoskeleton remodeling. IL-4 may upregulate the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), induce hyperpermeability and cause microvascular leakage (21). By morphological criteria, IL-4-expressing cells in COVID-19 patients include alveolar M2 macrophages and type II pneumocytes. It is unclear whether a fraction of the IL4-expressing cells found in the alveolar septa are represented in the single-cell RNA sequencing profiles generated from peripheral blood mononuclear cells of COVID-19 patients. Interestingly, there is a precedent that IL-4 can induce hyperpermeability of vascular endothelial cells through the activation of the Wnt5A signaling pathway (21).

The presence of mast cells at the site in human tissues associated with its ability to release proangiogenic VEGF-A, histamine, tumor necrosis factor- α and several other vasoactive mediators of endothelial activation in the inflamed alveolar septa may have an indirect impact on platelet adhesion to the endothelial lining, and subsequent fibrin formation via cooperative activation of extrinsic/intrinsic pathways of coagulation (14, 15, 22). Inevitably, under the adverse influence of the cytokine storm, the risk of the microthrombi formation may increase. Besides, SARS-CoV-2 infection can induce lung tissue damage, resulting in activation, aggregation, and entrapment of the platelet leading to thrombosis and consumption coagulopathy (23).

While supporting the notion drug targeting of the KKS/B2R/B1R axis may protect patients from SARS (24), the experimental findings and arguments outlined in this study should encourage clinicians to conduct randomized trials to evaluate the potential benefit of low-cost therapy with MC stabilizers. Another potentially useful strategy could be to target the subsets of chemokines that presumably recruit C-kit positive MC progenitors to the injured/infected alveolar tissue, or by blocking the activity of mediators and growth factors drive MC maturation in the alveolar septa (25–27). This is the first report in the literature showing that increased MC density is a distinguishing pathological feature in the lungs of COVID-19 patients compared to H1N1-induced pneumonia.

The contrasting scores of CD117⁺ cells and MC numbers (TB) in the alveolar septa of COVID-19 vs. H1N1 groups might reflect different rates of progenitors to the lung. Since TB staining is dependent on the presence of granules in the cytoplasm of tissue MCs when activated, MC may be undergoing active degranulation and showing reduced granule proteins in their cytoplasm, which in turn would reduce TB staining. Hence tissue MC degranulation could explain a discrepancy between CD117 and TB staining in the alveolar septa. Additional clinical studies are required to determine whether these discrepant

phenotypes are due to age factors or a more extended time from hospitalization to death of COVID-19 patients (mean 12.8 days) than H1N1 patients (mean 4.7 days). Finally, the finding that CD117⁺ cells showed higher scores (about 5-fold over TB) suggests that the c-kit positive cells could include MCs and their progenitors, blood progenitor cells, CD31⁺ cells, and type 2 innate lymphoid cells (28).

Our study presents some limitations that merit consideration. Given the scarcity of larger samples of collected post-mortem lung biopsies in this highly contagious environment of COVID-19 Intensive Care Units, our sample is limited. It is essential to interpret our findings with caution and validate them in other samples to replicate our results. Additionally, data based on FFPE post-mortem samples only provide static information at the time of death. They cannot reconstruct the evolving disease process. Furthermore, the COVID-19 and H1N1pdm09 are different pandemic diseases concerning their demographic risk groups, pathophysiology mechanisms, and coinfection prevalence.

In conclusion, we propose that drugs that uncouple the MC link to pro-inflammatory proteolytic networks, such as complement and the kallikrein-kinin cascade, may inhibit interstitial edema in the alveolar septa. By protecting the microvasculature from excessive leakage, MC stabilizing drugs may limit the intra-alveolar formation of the hyaline membrane while attenuating immunothrombosis in severe COVID-19.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by National Research Ethics Committee (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa—CONEP), protocol number 3.944.734/2020 and 2.550.445/2018. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JM, AM, CB, JS, and LN: study design, data collection, writing, and critically reviewing the manuscript. JM, AM, SN, CP, and LN: data analysis and interpretation. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

AM was a recipient from a CAPES COVID 19 scholarship, LN was a researcher from CNPq, and JS was a recipient of FAPERJ/Pronex E-26/210.899/2016; CNE E-26/202.911/2017 CNPQ/Uni 432841/2016-4.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.574862/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Photomicrographs of the COVID-19 group samples (C1–C6) showing IL-4 tissue expression mainly in pneumocytes (asterisks), CD117⁺ nucleated cells (black arrows), degranulating (black arrow), and depleted (dashed arrow) MCs and some free granules dispersed (arrowhead) in the alveolar septa and perivascular spaces.

REFERENCES

- Marini JJ, Gattinoni L. Management of COVID-19 respiratory distress. *J Am Med Assoc.* (2020) 323:2329–30. doi: 10.1001/jama.2020.6825
- Fox SE, Akmatbekov A, Harbert JL, Li G, Brown JQ, Heide RSV. Pulmonary and cardiac pathology in Covid-19: the first autopsy series from New Orleans. *medRxiv.* (2020) 2020.04.06.20050575. doi: 10.1101/2020.04.06.20050575
- Henry BM, Vixie J, Benoit S, Favalaro EJ, Lippi G. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: a novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta.* (2020) 507:167–73. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.027
- Nascimento CR, Andrade D, Carvalho-Pinto CE, Serra RR, Vellasco L, Brasil G, et al. Mast cell coupling to the kallikrein-kinin system fuels intracardiac parasitism and worsens heart pathology in experimental chagas disease. *Front Immunol.* (2017) 8:840. doi: 10.3389/fimmu.2017.00840
- Guilarte M, Sala-Cunill A, Luengo O, Labrador-Horrillo M, Cardona V. The mast cell, contact, and coagulation system connection in anaphylaxis. *Front Immunol.* (2017) 8:846. doi: 10.3389/fimmu.2017.00846
- Scharfstein J. Subverting bradykinin-evoked inflammation by co-opting the contact system. *Curr Opin Hematol.* (2018) 25:347–57. doi: 10.1097/MOH.0000000000000444
- Marshall JS, Portales-Cervantes L, Leong E. Mast cell responses to viruses and pathogen products. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:1–18. doi: 10.3390/ijms20174241
- Kritas SK, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Conti P. Mast cells contribute to coronavirus-induced inflammation: new anti-inflammatory strategy. *J Biol Regul Homeost Agents.* (2020) 34:9–14. doi: 10.23812/20-Editorial-Kritas
- Theoharides TC. COVID-19, pulmonary mast cells, cytokine storms, and beneficial actions of luteolin. *Biofactors.* (2020) 46:306–8. doi: 10.1002/biof.1633
- Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell.* (2020) 181:1036–45.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026
- Wang HQ. Comparison of epidemiological and clinical characteristics of SARS, pandemic (H1N1) 2009 and COVID-19, and consideration of the prevention and control strategies on COVID-19. *Zhonghua yu Fang yi xue za zhi.* (2020) 54:713–9. doi: 10.3760/cma.j.cn112150-20200403-00508
- Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2020) 117:10970–5. doi: 10.1073/pnas.2005615117
- Sala-Cunill A, Björkqvist J, Senter R, Guilarte M, Cardona V, Labrador M, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 135:1031–43.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.07.057
- Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Björkqvist J, Tradler T, et al. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunology.* (2011) 34:258–68. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.008
- Moreno-Sanchez D, Hernandez-Ruiz L, Ruiz FA, Docampo R. Polyphosphate is a novel pro-inflammatory regulator of mast cells and is located in acidocalcisomes. *J Biol Chem.* (2012) 287:28435–44. doi: 10.1074/jbc.M112.385823
- Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* (2005) 11:875–9. doi: 10.1038/nm1267
- Sodhi CP, Wohlford-Lenane C, Yamaguchi Y, Prindle T, Fulton WB, Wang S, et al. Attenuation of pulmonary ACE2 activity impairs inactivation of des-arg9 bradykinin/BKB1R axis and facilitates LPS-induced neutrophil infiltration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2018) 314:L17–31. doi: 10.1152/ajplung.00498.2016
- Carvelli J, Demaria O, Vely F, Batista L, Benmansour NC, Fares J, et al. Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a-C5aR1 axis. *Nature.* (2020). doi: 10.1038/s41586-020-2600-6. [Epub ahead of print].
- Wang J, Lindholt JS, Sukhova GK, Shi MA, Xia M, Chen H, et al. IgE actions on CD4⁺ T cells, mast cells, and macrophages participate in the pathogenesis of experimental abdominal aortic aneurysms. *EMBO Mol Med.* (2014) 6:952–69. doi: 10.15252/emmm.201303811
- Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature.* (2020) 584:463–9. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y
- Skaria T, Burgener J, Bachli E, Schoedon G. IL-4 causes hyperpermeability of vascular endothelial cells through Wnt5A signaling. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0156002. doi: 10.1371/journal.pone.0156002
- Ponomarev T, Payne H, Fabritz L, Wagner DD, Brill A. Mast cells granular contents are crucial for deep vein thrombosis in mice. *Circ Res.* (2017) 121:941–50. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311185
- Zhao X, Wang K, Zuo P, Liu Y, Zhang M, Xie S, et al. Early decrease in blood platelet count is associated with poor prognosis in COVID-19 patients—indications for predictive, preventive, and personalized medical approach. *EPMA J.* (2020) 11:139–45. doi: 10.1007/s13167-020-00208-z
- van de Veerdonk FL, Netea MG, van Deuren M, van der Meer JW, de Mast Q, Brüggemann RJ, et al. Kallikrein-kinin blockade in patients with COVID-19 to prevent acute respiratory distress syndrome. *Elife.* (2020) 9:e57555. doi: 10.7554/eLife.57555.sa2
- Weng Z, Patel AB, Panagiotidou S, Theoharides TC. The novel flavone tetramethoxyluteolin is a potent inhibitor of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 135:1044–52.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.032
- Patel AB, Theoharides TC. Methoxyluteolin inhibits neuropeptide-stimulated proinflammatory mediator release via mTOR activation from human mast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* (2017) 361:462–71. doi: 10.1124/jpet.117.240564
- Bawazeer MA, Theoharides TC. IL-33 stimulates human mast cell release of CCL5 and CCL2 via MAPK and NF- κ B, inhibited by methoxyluteolin. *Eur J Pharmacol.* (2019) 865:172760. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172760
- Zhou Y, Pan P, Yao L, Su M, He P, Niu N, et al. CD117-positive cells of the heart: progenitor cells or mast cells? *J Histochem Cytochem.* (2010) 58:309–16. doi: 10.1369/jhc.2009.955146

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Motta Junior, Miggiolaro, Nagashima, de Paula, Baena, Scharfstein and de Noronha. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Respiratory Medicine Case Reports 31 (2020) 101292

Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Medicine Case Reports

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/rmcr>




Case report



Covid-19 cytokine storm in pulmonary tissue: Anatomopathological and immunohistochemical findings

Anna Flavia Ribeiro dos Santos Miggiolaro ^a, Jarbas da Silva Motta Junior ^a,
 Caroline Busatta Vaz de Paula ^a, Seigo Nagashima ^a, Mineia Alessandra Scaranello Malaquias ^a,
 Lucas Baena Carstens ^b, Andrea N. Moreno-Amaral ^c, Cristina Pellegrino Baena ^d,
 Lucia de Noronha ^{a,*}

^a Postgraduate Program of Health Sciences - School of Medicine, Hospital Marcelino Champagnat, Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil
^b School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil
^c Laboratory Anemia and Immunology Research (LabAIRa) - School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil
^d Postgraduate Program of Health Sciences - School of Medicine, Center of Education, Research and Innovation - Hospital Marcelino Champagnat, Pontifícia Universidade Católica do Paraná - R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil
^e Laboratory of Experimental Pathology - School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 COVID-19
 Biopsy
 Interleukin-6
 Cell adhesion molecules
 Systemic inflammatory response syndrome

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic is a worldwide threat, and information on physiopathological aspects of the disease is limited. Despite efforts in searching treatment options, a better understanding of the SARS-CoV-2 pathways can contribute to managing severe cases. In this study, we aim to describe pathological and immunopathogenic findings of two different cases, both in the high-risk group. Post-mortem lung biopsies were analyzed by traditional and immunohistochemical methods. Tissue expression of innate and adaptive immune response biomarkers was tested. We observed a higher innate response in case 1 with an abundance of mast cells, scarce CD8⁺ lymphocytes, high expression of TNF- α , and almost absent adaptive immune response. In case 2, the adaptive immune response was present, with numerous CD8⁺ lymphocytes and higher levels of IL-4 and TGF- β . Both cases converged to a prothrombotic state expressing high IL-6, followed by ICAM-1 expression and endothelitis leading to systemic inflammatory response syndrome. In conclusion, differences in age and comorbidities and immune response described here may be related to the SARS-CoV-2 delay in the adaptive immune response, evolution stage of diffuse alveolar damage, and progression for systemic inflammatory response syndrome.

1. Introduction

The world is currently going through the COVID-19 pandemics, and the death toll is still on the rise worldwide. Amidst this troubling time, researchers and health care providers strive to find the best therapeutic strategies, and despite all efforts, there is still no robust evidence towards a definitive treatment.

Patients infected with the SARS-CoV-2 tend to develop acute respiratory distress syndrome (ARDS) presenting ground-glass opacities on

chest computed tomography exams [1], and studies show about 3.2% of patients in China required the onset of assisted breathing therapies such as intubation [2].

The SARS-CoV-2 pandemic is unique due to a few notable features in the virus: first, we observe its high affinity to the angiotensin-converting-enzyme-2 (ACE-2) receptors [3]; secondly, it is high glycosylated spike proteins that have low immunogenicity, thirdly its recent leap from animal to human meaning that there is a high susceptibility rate. The high viability in the external environment and, finally, delayed

* Corresponding author. Laboratory of Experimental Pathology - School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil.

E-mail address: lmo.noronha@gmail.com (L. de Noronha).

<https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2020.101292>

Received 16 August 2020; Received in revised form 21 October 2020; Accepted 7 November 2020

Available online 12 November 2020

2213-0071/© 2020 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

adaptive immune response to the virus means patients are vectors for this virus for long periods. All these factors may contribute to the quick and sustained spreading of the virus [4–6].

Once infection reaches the lungs, pneumocytes and macrophages will initiate an innate immune response favoring a disproportionate immunologic response and endotheliitis with microthrombi formation [4], pathological injuries also recently called endotheliopathy and immunothrombosis [7,8]. The complement cascade activation is then followed by the phenomenon referred to as a cytokine storm that will culminate on endothelial activation and consequently may cause a Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) with multiple organ failure and death [9].

In this article, we described findings of two post-mortem biopsies, the first being an 87-year-old woman with various comorbidities and the second a 53-year-old, obese, man without any other previous illness known. We assessed the immune response to the SARS-CoV-2 infection of these two cases and possible immunopathogenic mechanisms of the therapeutic modalities being tested during this outbreak.

2. Methods

2.1. Ethics approval

The National Research Ethics Committee approves this study (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP - 3.944.734/2020), and families consented to the post-mortem biopsy.

2.2. Medical records

Clinical data of both cases were obtained from medical records during hospitalization in the Intensive Care Unit (ICU) at Hospital Marcelino Champagnat in Curitiba-Brazil. Testing for COVID-19 was performed on nasopharyngeal swabs taken during ICU hospitalization, and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rRT-PCR) performed was positive for SARS-CoV2 in both cases.

2.3. Biopsy technique and analysis

2.3.1. Autopsy procedure

Initially, the imaging exams such as X-rays and CT's were analyzed to identify the pulmonary segments that have been lesioned, especially the lingular lobe, since it is removed in a more agile and practical technique of minimally invasive biopsy. Once we confirmed a radiographically evident lesion on the lingular segment in the upper left pulmonary lobe, we proceeded to collect the sample through a left anterior mini-thoracotomy on the fourth or fifth intercostal space.

2.3.2. Sample collection

In cases 1 and 2, the samples were similarly sized (3 × 3 cm), and the samples were delicately handled and resected using surgical scissors. Both samples presented normal pulmonary consistency. The samples were then inserted into a 10% concentration formalin solution and kept in it for at least 24 hours until blocking and slicing for microscopic analysis.

The lung formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E). The immunohistochemistry technique was used to identify innate and adaptive immunity biomarkers (Fig. 1 - scheme).

3. Case DESCRIPTION

3.1. Case 1

Female, 87 years old, presenting systemic arterial hypertension (SAH), dyslipidemia, hypothyroidism, and senile dementia with two previous hospitalizations in less than 15 days. The first one, two weeks

before the present hospitalization when she had a diagnosis of femur fracture, in which she had contact with a COVID-19 person (assistant physician). The second hospitalization was due to gastrointestinal bleeding (endoscopic diagnosis of Mallory Weiss laceration of the esophageal mucosa). Two days before going to the emergency department, she had flu-like symptoms without a fever. In the first hours of hospitalization, her breathing pattern worsened, requiring mechanical ventilation and vasoactive drugs. The patient's illness progressed with SIRS.

Pronation maneuver was necessary to maintain PaO₂/FiO₂, but the patient developed multiple organ dysfunction and died on the 8th day of hospitalization (see Table 1).

3.2. Case 2

Male, 53 years old, class II obesity, reported traveling to the COVID-19 endemic area ten days before going to the emergency department. He had flu-like symptoms, fever, headache, and remained on spontaneous ventilation with supplemental oxygen therapy, progressing to respiratory failure and mechanical ventilation on the third day of hospitalization. During his hospitalization, his clinical condition evolved to SIRS.

Daily pronation measures were performed with good response, however, on the 10th day of hospitalization, he had a significant worsening of tissue oxygenation, requiring ECMO (Extracorporeal Membrane Oxygenation) and full anticoagulation, with diffuse bleeding as a complication, resulting in death at the 13th day of hospitalization and eighth day of mechanical ventilation (see Table 1).

4. Results

4.1. Pathological findings

Case 1 H&E analysis presented severe diffuse alveolar damage (DAD) with type II pneumocyte hyperplasia and a large number of hyaline membranes. Almost absent septal inflammatory infiltrate (neutrophils and lymphocytes) and very mild and focal intra-alveolar edema and red blood cells. There is hyperplasia of type II pneumocytes and marked endothelial activation with micro thrombosis and neutrophils on small vessel walls (endotheliitis) (Fig. 1).

In case 2, areas with preserved alveolar structure interspersed with foci of extensive alveolar fibrosis were observed. In fibrotic areas, we observed extensive alveolar collagenization associated with inflammatory infiltrate (lymphocytes and macrophages) and the presence of thickening of the vascular walls and squamous metaplasia. An intense endothelial activation with signs of endotheliitis was also observed (Fig. 1).

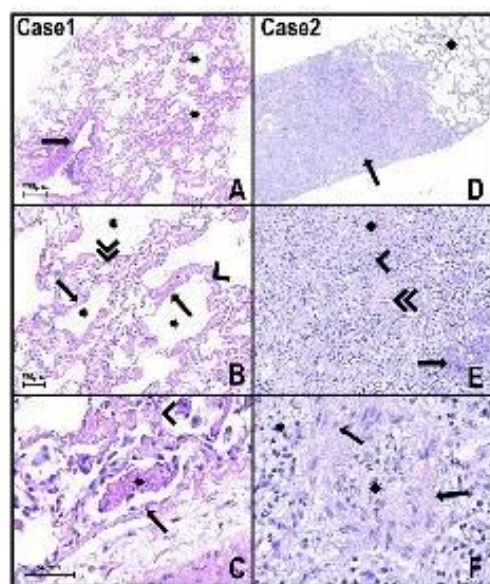
4.2. Immunohistochemical analysis

Case 1 revealed a predominance of innate response biomarkers tissue expression, such as ficolin 3 (FCN3) in hyaline membranes, IL-1 and TNF-alpha in pneumocytes and alveolar macrophages and abundant mast cells (CD117). Also, a slight expression of adaptive response tissue biomarkers such as CD8⁺ lymphocytes and IL-4, IL-13, and TGF-beta in type II pneumocytes and alveolar macrophages (Figs. 1 and 2).

In case 2, the expression of innate and adaptive response was the opposite of case 1. There was a scarce innate response, such as lower FCN3, IL-1, TNF-alpha, CD117 tissue expression. Also, a predominance of adaptive response was observed, such as higher CD8, IL-4, IL-13, and TGF-beta tissue expression (Figs. 1 and 2).

Markers highly expressed in both cases were CD163 (macrophages), SPHINGO (M2 macrophages), IL6 (pneumocytes and alveolar macrophages), and ICAM-1 (activated endothelium and pneumocytes) (Figs. 1 and 2).

In both cases, markers that were equally under-expressed were IL-10, IL-8, and IL-17 in type 2 pneumocytes and macrophages (Figs. 1 and 2).



(caption on next column)

Fig. 1. H&E Photomicrographs of lung tissue from two COVID-19 cases.

A: The panoramic view of the lung sample of case 1 shows one bronchiole (arrow) without histopathological alterations. There are alveoli (asterisks) with multifocal thick hyaline membranes that characterize diffuse alveolar damage (DAD).

B: Numerous alveoli (asterisks) with thick hyaline membranes (arrows) covering delicate alveolar septa (arrowhead). The septal inflammatory infiltrates very mild or almost absent, composed mainly of lymphocytes and some neutrophils, and the septal capillaries are congested (double arrowhead). There is very subtle and focal intra-alveolar edema with slight red cell overflow in some foci. Type II pneumocyte hyperplasia can also be observed.

C: There are some alveolar capillaries and small vessels with signs of endothelial activation (arrows); microthrombi (asterisk), and endothelitis. Hyaline membranes are recovering delicate septa with very rare lymphocytes and neutrophils (arrowhead).

D: Panoramic view of lung samples of case 2 shows scattered areas of pulmonary fibrosis (arrows) interspersed with areas of histologically preserved lung tissue (asterisk).

E: Lung fibrosis area with collagen and fibroblasts (asterisk) and inflammatory infiltrate (arrowhead). The pulmonary vessels also show signs of endothelial activation and endothelitis. There is also a thickening of the wall of medium and small arteries (double arrowhead), in addition to foci of squamous metaplasia (arrows).

F: The pulmonary fibrosis areas presented with dense inflammatory infiltrate composed mainly of lymphocytes, macrophages (arrows), and fibroblasts interspersed with areas of intense collagenization (asterisks).

Scheme of Innate and adaptive responses present in cases of COVID-19: In these cases, in response to necrosis of pneumocytes injured by SARS-CoV-2, we note the massive presence of mast cells (CD117) and macrophages (CD163), capable of secreting cytokines such as TNF- α and interleukins (IL) type 1 and 6, respectively. IL-6 and TNF- α could elevate vascular permeability, promoting exudation of plasma proteins, including fibrinogen (FCN3). FCN3 and other plasma proteins inside the alveoli lumen are responsible for promoting opsonization, activating the complement and the coagulation cascade, and, as observed in the present work, promoting hyaline membranes. The presence of IL-1 and TNF- α , inducing massive expression of ICAM-1 in both cases, can promote the activation of endothelial cells and endothelitis and may be involved in the progression for systemic inflammatory response syndrome (SIRS). APCs can present the antigens for T lymphocytes, via MHC (main histocompatibility complex), and secreting cytokines that play critical roles in the differentiation of T cells into effector cells. APCs express MHC I molecules and present TCD8+ lymphocytes.

On the other hand, macrophages and APC activate TCD4+ lymphocytes via MHC II, organizing responses classified into subgroups, such as Th1, Th2, Th17, depending on cell differentiation. In case 1 of the present study, a high immunoreexpression of CD117 (mast cells) FCN3, TNF- α , IL-1, and IL-6 is observed, suggesting that the inflammatory process is sustained, mainly, through innate immunity. Besides, there is a low number of TCD8+ lymphocytes, suggesting that adaptive immunity is not still adequately stimulated. In contrast, in case 2, in addition to the presence of TCD8+ lymphocytes, there is a marked expression of Sphingosine (M2 macrophages), IL-4, IL-13, and TGF β , suggesting the presence of adequately stimulated of adaptive immunity with a tendency to resolve with fibrogenesis. A slight immunoreexpression IL-8 and IL-17 is also observed, suggesting low stimulation of the Th17 response and explaining the almost absence of alveolar neutrophil migration. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

5. Discussion

Based on two lung biopsies, our immunohistochemical findings may be related to the SARS-CoV-2 ability to induce an earlier and sustained Th2 response along with a marked release of innate immune cytokines.

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a clinical condition that affects patients with a multitude of diseases ranging from cases of pneumonia to exposition to toxic fumes [10]. This process is characterized by the typical histological finding of Diffuse Alveolar Damage (DAD) in its acute phase, as well as type II pneumocyte hyperplasia and hyaline membranes, and the condition evolves to tissue organization and fibrosis [11]. In this context, both patients showed evident signs of

Table 1
Summary of ventilatory parameters, therapeutic interventions, tomographic, and laboratory results.

	CASE 1 - 87-year-old woman	CASE 2 - 53-year-old man
Comorbidities	Systemic Arterial Hypertension Dyslipidemia Hypothyroidism Senile dementia	Class II obesity
Chronic use drugs	Losartan 50mg/day	No
Ventilatory parameters	Decreased positive end-expiratory pressure (PEEP), with ideal PEEP = 10 Compliance = 52 cmH ₂ O Plateau pressure of 24 cmH ₂ O Driving pressure of 14 cmH ₂ O Inspiratory fraction of oxygen (FiO ₂) of 80% Pressure partial Oxygen (PaO ₂): PaO ₂ /FiO ₂ = 126 Partial response - PaO ₂ /FiO ₂ ratio of 191 Diffuse and bilateral "opacities with ground-glass attenuation" Thickening of the pulmonary septum, suggestive of viral pulmonary infection	Decreased positive end-expiratory pressure (PEEP), with ideal PEEP = 08 Compliance = 65 cmH ₂ O Plateau pressure = 19 cmH ₂ O Driving pressure = 11 cmH ₂ O Inspiratory fraction of oxygen (FiO ₂) = 50% Pressure partial Oxygen (PaO ₂): PaO ₂ /FiO ₂ = 132 Adequate response - PaO ₂ /FiO ₂ ratio = 270 Diffuse and bilateral "opacities with ground-glass attenuation", suggestive of viral pulmonary infection
Pronation maneuver	Admission	Admission
Computed tomography		
Admission laboratory tests	C-Reactive Protein = 313 mg/L; D-dimer = 2014 µg/dt; Total leukocytes = 15,100/ neutrophils = 1208 (8%) and lymphocytes = 604 (4%); Creatinine = 1.1 mg/dL C-Reactive Protein = 201 mg/dL; Leukocytes = 15,000/ neutrophils = 2400 (16%) and lymphocytes = 1200 (8%); Creatinine = 2.65 mg/dL Hydroxychloroquine 800 mg/day on the 1st day and 400 mg/day on the other days + Azithromycin 500 mg/day for 5 days; Oseltamivir 150 mg/day for 5 days Piperacillin + Tazobactam 18 mg/day	C-Reactive Protein = 146 mg/L; D-dimer = 425 µg/mL (normal); Total leukocytes = 11,000/ neutrophils = 550 (5%) and lymphocytes = 990 (9%); C-Reactive Protein = 133 mg/dL; Leukocytes = 50,200/ neutrophils = 3012 (6%) and lymphocytes = 3514 (7%); Hydroxychloroquine 800 mg/day on the 1st day and 400 mg/day on the other days + Azithromycin 500 mg/day for 5 days; Oseltamivir 150 mg/day for 5 days; Ceftriaxone 2g/day
Laboratory tests (24 hours before death)		
Therapeutic drugs		
Invasive procedure	No	ECMO (Extracorporeal Membrane Oxygenation)

ARDS in different stages, while patient 1 showed more acute signs of ARDS such as type II pneumocyte hyperplasia and hyaline membranes; patient 2 was already in the organization phase with evident fibrosis and scarce hyaline membranes.

Although laboratory findings evidenced SIRS in both cases, there were differences in serum lymphocyte levels at admission and lymphopenia in case 1. There is evidence that lymphopenia is a useful indicator of the severity and hospitalization in COVID-19 patients [12]. Besides, in case 1, histopathological analysis revealed few TCD8 + lymphocytes in the alveolar septa, which may have been caused by the marked lymphopenia.

The D-dimer level was a fourfold increase in case 1, average in case 2, and high levels on admission could effectively predict mortality in patients with COVID-19 [13]. Accordingly, case 1 presented the foci of micro thrombosis in capillaries and small-caliber pulmonary vessels.

The radiological findings, ventilatory parameters applied,

therapeutic administered, clinical and laboratory evidence of impaired tissue oxygenation, and finally, the pronation protocol was comparable in both cases. We may hypothesize that the virus infection per se may cause all pathologic changes into lung-morphology since the ventilation of the patients during the intensive care unit (ICU) hospitalization was gentle and controlled.

SIRS caused by Cytokine Release Syndrome (CRS) or Cytokine Storm may have an essential role in the outcome of these two patients [4,9]. Diffuse Alveolar Damage (DAD) is a sign in critically ill COVID-19 infected patients [14,15], and, during its activation, the inflammatory response must be strictly regulated to prevent systemic damage (SIRS).

The lung injury caused by SARS-CoV-2 appears to begin in the upper airways where the virus replicates in the ACE-2 receptor rich respiratory mucosa [5,6]. After reaching the alveoli, the virus begins to replicate in the pneumocytes, causing cell death and alveolar septum collagen exposure. The pneumocyte necrosis causes IL-6 and TNF-alpha to be released and mast cell degranulation [4]. This scenario would lead to the triggering of the coagulation and complement cascades; it would also increase vascular permeability [9]. A sequent formation of hyaline membranes characteristic of the acute phase of DAD (case 1) is seen. In approximately two weeks of evolution, DAD initiates its resolution phase, and the hyaline membranes are replaced by type II pneumocyte hyperplasia, a chronic inflammatory process followed by pulmonary alveolar fibrosis, as shown in case 2 [14,15]. Notably, in case 1 (87-year-old woman), there is no significant alveolar edema, commonly seen in acute cases of DAD. Neutrophils and lymphocytes in the alveolar septa are also not seen, another characteristic commonly seen in viral interstitial pneumonitis. Neither case showed signs of secondary bacterial infections, a common cause of death for patients with viral pneumonitis and DAD [14].

Our combined results showed an increased number of mast cells (CD177) with TNF-alpha, IL-6, and IL-1 release (Th2 response) in case 1 and lower levels of these parameters in case 2. We also observed a high number of macrophages (CD163) in both cases. Mast cells and macrophages releasing TNF-alpha in airways with a Th2 response predisposition, as observed in case 1, have high potential to contribute to DAD [16,17]. However, in case 2, the Th2 response was still found. In our observation, case 1 showed few Th1 immune responses since the number of TCD8+ lymphocytes was discrete, contrary to case 2. Different stages of lung injury among cases could explain this discrepancy. Case 1 might have died before the fibrotic response was activated, and the immune senescence might play a role as well. While there is a four-day gap between both patients from hospitalization date to the death date, the lack of fibrotic response and inflammatory infiltrate might not be only to the time of disease progression but also to the patient's ability to respond to the infection and the effective immune response. Thus, the age gap and inherent predisposition to a Th1 or Th2 response may play significant roles in the final lung fibrosis and tissue remodeling.

The spectrum of SARS-CoV-2 injuries and their symptoms, from asymptomatic to the most severe forms, could also be related to the individual genetic background that could drive the initial prevalent Th2 response without an effective antiviral Th1 immunity since this Th1 response could be activated later. Another explanation could be the high spike proteins glycosylation present in SARS-CoV-2, which would hinder the antigenic presentation and the recollection of the virus by T cells. However, the impact of individual immune responses on the severity of SARS-CoV-2 infection is not clear [6,18].

An unusual lack of alveolar neutrophils was found and could be explained by the low expression of IL-8 and IL-17 in both cases. As the IL-17A/IL-8 are pro-inflammatory cytokines mainly dependent on activated T cells, the poor (case 1) and later (case 2) Th1 response of cases could explain this phenomenon [19].

Deposition of Ficolin-3 (FCN3) within lung septal microvasculature has been described, promoting complement system activation in COVID-19. We observed the expression of FCN3 in both cases, more evidently in case 1 (acute phase). The complement cascade precedes endothelial

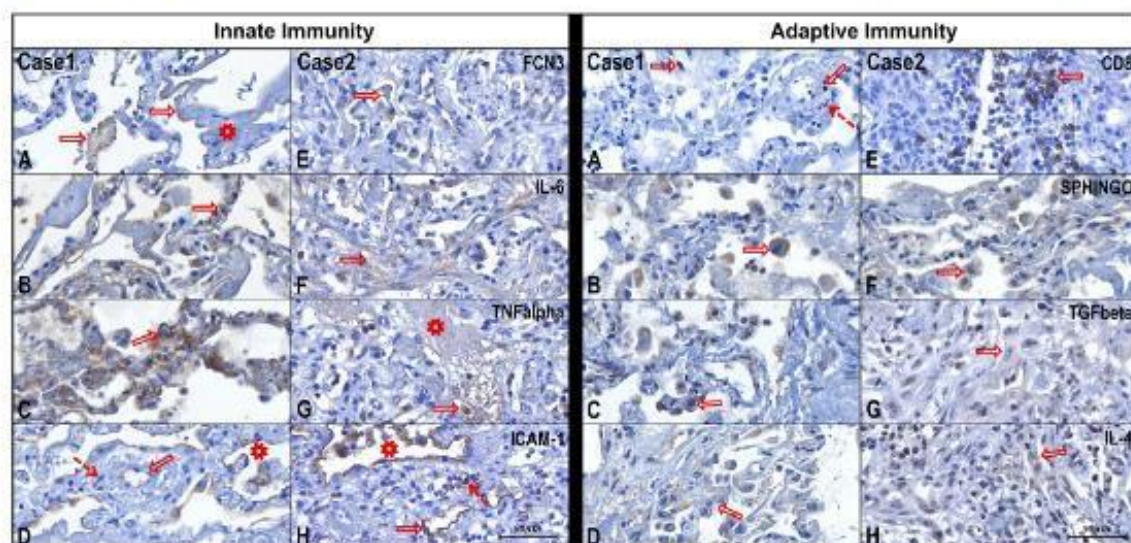


Fig. 2. Case 1 – Innate Immunity - Photomicrographs from A to D

In photomicrograph A it can be observed FCN3 (arrows) expressed along the thick hyaline membranes (asterisk).

In B, it observed the expression of IL-6 in the alveolar septum (arrow) by lymphocytes, type II pneumocytes, and alveolar macrophages.

In C, it can observe the expression of TNF alpha in the alveolar septum (arrow) by type II pneumocytes and alveolar macrophages.

In D, it observed endothelium (arrow) and pneumocytes (asterisk) expressing ICAM-1. Presence of polymorphonuclear cells permeating the vascular wall (dashed arrow) configuring endotheliitis.

Case 2 – Innate Immunity - Photomicrographs from E to H

In photomicrograph A, there is a scarce expression of FCN3 in a few alveoli still with remaining hyaline membranes (arrow).

In B, it can observe a marked expression of IL-6 in the areas of fibrosis (arrow).

In C, it can observe a discrete expression of TNF alpha (arrow) only in a few alveoli with remaining hyaline membranes (asterisk).

In D, it observed a marked expression of ICAM-1 in endothelial cells (arrow) and pneumocytes (asterisk). Vessels show activation of endothelial cells and endotheliitis (dashed arrow).

Case 1 – Adaptive Immunity - Photomicrographs from A to D

In photomicrograph A, it can be observed scattered (about 2 per medium power field) CD8⁺ T lymphocytes (arrows). Vessel with polymorphonuclear cells on its wall (dashed arrow) configuring endotheliitis.

In image B, it observed numerous alveolar macrophages (arrow) expressing SPHINGOSINE, which characterizes the M2 type macrophage.

In C, it can be observed a slight expression of TGF-beta in type II pneumocytes (arrow) and alveolar macrophages.

The photomicrograph D can observe moderate expression of IL-4 in type II pneumocytes (arrow) and alveolar macrophages.

Case 2 – Adaptive Immunity - Photomicrographs from E to H

In photomicrograph A, it can observe numerous (about 20–30 per medium-magnification field) CD8⁺ T lymphocytes (arrow).

In image B, it observed numerous alveolar macrophages (arrow) expressing SPHINGOSINE, which characterizes the M2 type macrophage.

In C, it observed a moderate expression of TGF-beta in macrophages and fibroblasts (arrow).

It can observe moderate to a marked expression of IL-4 (arrow) in macrophages and lymphocytes in photomicrography D.

injury and leads to the clotting pathway activation culminating in systemic micro thrombosis and multiple organ failure [20].

Moreover, endotheliopathy and immunothrombosis may have a crucial role in SIRS observed in patients with COVID-19, as some studies described the endothelium as a potential target of the SARS-CoV-2 since they are described to express ACE-2 type receptors [21]. We also observed high expression of ICAM-1, suggesting endothelial activation as a common finding in both cases.

IL-6 levels have been associated with mortality and could be an indicator of its protagonism in the cytokine storm in COVID-19 [22], as observed in both our cases.

Regarding multiple organ failure, the patient's advanced age in case 1 could compromise the immune system activation "per se," as shown by the inadequate adaptive immune response observed with scarce of TCDS⁺ lymphocytes, however, even with higher expression of CD8⁺ lymphocytes in case 2, the fibrosis promoted by M2 macrophage (SPHINGO) induced by a higher expression of TGF-beta, IL-13 and IL-4 that could explain the severity of lung damage observed in this case [23]. It is also important to consider that case 2 underwent 24 hours of extra corporeal membrane oxygenation and received vasoactive drugs and blood transfusion before death as these procedures may have interfered in this case's final outcome.

Clinical trials are looking at whether blocking one or more of these pro-inflammatory mediators would affect clinical outcomes. TNF-alpha blockers, IL-1 inhibitors, IL-6 antagonists, as well as complement inhibitors can reduce pro-inflammatory cytokines [3] and activation of M1/M2 macrophages leading to decreased expression of ICAM-1 and less endothelial activation and endotheliitis. The use of corticosteroids in COVID-19 could attenuate mast cells' stimulation contributing to triggering the cytokine storm [9,24,25].

This study analyzed two post mortem samples through immunohistochemistry and therefore has a limited number of patients. Besides, autopsies samples only allow for end-stage and static observation. This analysis does not necessarily reflect the evolving changes in the disease course. The patients were from different risk groups that might have influenced their immune response, thus influencing the interpretation of our results.

In summary, different immune responses presented here may be related to the SARS-CoV-2 intrinsic characteristics delaying Th1 and exacerbating Th2 response, to the stage of DAD, as well as the clinical characteristics of patients, such as age and presence or absence of comorbidities. Therefore, managing the cytokine storm, the direct virus-induced tissue damage, or the synergistic effects of both phenomena warrant further clarification.