

1  
2

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7

Mônica Miguel Sawan Mendonça

8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

**“ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA E HUMORAL EM CRIANÇAS  
COM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS RECORRENTES”.**

18  
19  
20  
21  
22  
23



25  
26  
27

Uberaba – MG  
2021

3  
4

Mônica Miguel Sawan Mendonça

28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

**“ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA E HUMORAL EM CRIANÇAS  
COM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS RECORRENTES”.**

43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração Clínica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Virmondês Rodrigues Júnior.

62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69

Uberaba – MG  
2021

70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112

**Catálogo na fonte:**  
**Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

M496a Mendonça, Monica Miguel Sawan  
Análise da resposta imune inflamatória e humoral em crianças com  
infecções respiratórias recorrentes / Monica Miguel Sawan Mendonça.  
-- 2022.  
84 f. : il., graf., tab.

Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Infectologia) -- Universi-  
dade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022  
Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

1. Imunidade. 2. Inflamação. 3. Infecções respiratórias. 4. Criança.  
I. Rodrigues Júnior, Virmondes. II. Universidade Federal do Triângulo  
Mineiro. III. Título.

CDU 612.017

Cicera Daniele da Silva - CRB-6/3012

113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159

Mônica Miguel Sawan Mendonça

**“ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA E HUMORAL EM CRIANÇAS  
COM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS RECORRENTES”.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração  
Clínica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, do  
Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal  
do Triângulo Mineiro, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutora.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. João Paulo Silva Servato  
Universidade de Uberaba - UNIUBE

---

Prof. Dr. Lúcio Roberto Cansado Castellano  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

---

Profa. Dra. Virgínia Resende Silva Weffor  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

---

Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

---

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

9  
10

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

**DEDICATÓRIA**

188

## DEDICATÓRIA

189

190           Quero dedicar esse trabalho a minha família. Ao meu marido Leandro, que  
191 soube me compreender quando eu não tinha tempo para dar atenção, esperar  
192 quando eu precisava dar prioridade aos estudos e principalmente me incentivar  
193 quando muitas vezes durante esse período, eu pensei em desistir. Nós dois  
194 sabemos o quanto foi difícil chegar até aqui, mas o importante é que batalhas são  
195 para serem vencidas e com essa não seria diferente, posso dizer que mais essa  
196 vencemos.

197           Dedico também às minhas filhas Rayssa e Tayssa, que souberam entender o  
198 meu momento, mesmo sabendo que coincidiria com o momento delas de estudar.  
199 Momento em que elas estão estudando e eu também decidi estar. Mas foi muito  
200 bom, foi uma oportunidade única, poder trocar informações com elas, em coisas que  
201 eu sabia e as informei, mas também aprendi muito com o que elas tinham para me  
202 ensinar. Tenho certeza que lá na frente, se elas um dia pensarem em desistir dos  
203 estudos, vão se lembrar que todo sacrifício vale a pena independentemente da  
204 idade. Que o conhecimento é a única coisa que ninguém pode nos tirar, que a busca  
205 pelo novo é o que nos impulsiona e o que nos mantém em pé. Vão entender que  
206 através dos estudos é que melhoramos como pessoa e que sem dúvida nenhuma, é  
207 a melhor herança que poderíamos deixar para elas.

208           Poderia ter feito essa pós-graduação há muito tempo atrás, mas Deus quis  
209 que fosse nesse momento, não tenho dúvida que esse é o melhor momento, o mais  
210 precioso, importante, esperado, planejado. O que Ele reserva para nós, sempre é  
211 muito especial. Aprendi isso com uma pessoa que independente de ter convivido  
212 pouco tempo com ela, nos deixou a mim e a meus irmãos muitos ensinamentos,  
213 principalmente o de esperar no tempo de Deus. Ter paciência, porque cada coisa  
214 tem sua hora, saber esperar, porque na hora certa as coisas acontecem. Essa  
215 pessoa é minha Mãe, a quem eu dedico esse trabalho também, pessoa ímpar, de  
216 uma sabedoria encantadora, pessoa acolhedora, sempre pronta a nos ensinar algo  
217 de alguma forma. Seu tempo conosco foi curto, mas seus ensinamentos e exemplos  
218 sempre estão muito vivos em meus pensamentos. Exemplo como professora na arte  
219 de ensinar e como mãe na arte de se doar.

220           Dedico também a uma pessoa que com todos os percalços da vida, nunca  
221 deixou que nada nos tirasse do nosso caminho, o único que ele conhecia, o do bem,  
222 da justiça, da honestidade. A quem, que com aproximadamente 20 anos de idade  
223 deixou sua família, pai, mãe, irmãos e foi viver em outro país onde constituiu família.  
224 A quem, que se teve algum sonho, algum dia, foi o nosso, de seus filhos, esse era o  
225 sonho dele. Nos amou do jeito dele, nos formou como pessoa e nos deu condições  
226 para que cada um de seus filhos tivesse uma profissão, nos deu suporte e graças a  
227 Deus, até há três meses atrás, Deus nos permitiu usufruir de sua companhia com  
228 muito encanto e tanta sabedoria. Obrigada meu pai.

229           Dedico aos meus irmãos, cunhados, que cada um, à sua maneira foi muito  
230 importante para minha formação, e a todas as pessoas que de uma forma ou de  
231 outra fizeram parte desse sonho.

232

233                           Muito obrigada!

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

15  
16

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

## **AGRADECIMENTOS**

267

## AGRADECIMENTOS

268

269           Quero agradecer primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade  
270 de sentir o que estou sentido agora, por mais uma etapa vencida, mais uma vez a  
271 sensação de dever cumprido. Agradeço por cada passo que dei, cada caminho que  
272 percorri, cada conhecimento que adquiri, cada pessoa que cruzei, pelas que me  
273 incentivaram, pelas que me barraram, tudo faz parte dos propósitos de Deus na vida  
274 da gente. Sempre foi assim e sempre vai ser. Esperar em Deus é assim, Esperança,  
275 Persistência, Providência e Livramentos, é nisso que acredito.

276           Quero agradecer aos meus pais Sawan e Rail pelo incentivo e exemplo nos  
277 estudos, ao meu marido e filhas pela convivência, pelo dia a dia, pela paciência.

278           Ao Professor Virmondes Rodrigues Junior, que além de chefe, aceitou me  
279 orientar no Mestrado e agora no Doutorado. Agradeço pela paciência, pelos  
280 ensinamentos, que com certeza foram fundamentais durante esse período, para que  
281 eu pudesse concluir mais essa etapa. Obrigada de coração.

282           Aos amigos do laboratório de Imunologia, professores, alunos, agradeço na  
283 pessoa da minha querida companheira do dia a dia Betânia Maria Ribeiro, quero  
284 cumprimentar e agradecer a cada um pela participação que tiveram na minha vida e  
285 nesse trabalho.

286           Aos Professores da Pós-graduação, agradeço na pessoa do Professor  
287 Marcus Vinicius da Silva, sempre tão presentes e dispostos a passar a nós alunos  
288 um pouco de seus conhecimentos.

289           Aos alunos da pós-graduação, pelos incentivos, ajudas, orientações,  
290 sugestões e por contribuírem com suas correções.

291           À Pós-graduação, ao Clever Lourenço de Souza e Marcelo Rossati, pelos  
292 esclarecimentos e orientações durante toda a caminhada.

293 À Dra. Nathalia Vieira Inácio Calapodopulos, por ter se disponibilizado a  
294 atender todas as crianças que fizeram parte desse trabalho, pela sua dedicação,  
295 carinho e atenção.

296 À UFTM porque além de ser o lugar onde trabalho, hoje posso dizer que é o  
297 lugar onde pude aperfeiçoar meus conhecimentos e onde sempre que possível,  
298 pretendo colocá-los em prática.

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

23  
24

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

**RESUMO**

346

347

348

349

350

**RESUMO**

351

352 **Justificativa:** Os fatores imunológicos podem estar associados ao aumento da  
353 susceptibilidade às infecções respiratórias e à frequência relativa dessas  
354 deficiências transitórias e parciais na infância. Compreender a capacidade de reação  
355 e resposta do sistema imune em seus diferentes compartimentos é importante para  
356 o melhor entendimento dos mecanismos que estão diretamente implicados na  
357 suscetibilidade às Infecções Respiratórias Recorrentes apresentadas pelas crianças,  
358 até que elas atinjam sua maturidade imunológica. **Objetivos:** Analisar a Resposta  
359 Imune Inflamatória e Humoral em crianças de 2 a 6 anos de idade, com Infecções  
360 Respiratórias Recorrentes. **Material e métodos:** Foram coletadas amostras de  
361 sangue periférico (5mL), obtidas por punção venosa, de crianças entre 2 a 6 anos de  
362 idade atendidas no ambulatório de pediatria geral da Universidade Federal Triângulo  
363 Mineiro (UFTM). Das amostras coletadas, 36 correspondiam ao grupo de crianças  
364 com Infecções Respiratórias Recorrentes, sem doença de base que justificassem as  
365 mesmas e 50 ao grupo controle (crianças híginas, sem história de Infecções  
366 Respiratórias Recorrentes), cujos pais aceitaram a participação no estudo,  
367 respondendo a um questionário contendo informações importantes para o mesmo.  
368 As células mononucleares foram separadas em gradiente de Ficcol hipaque e  
369 cultivadas por 24 horas em presença de Meio ou LPS, e as citocinas pró e anti-  
370 inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, e IL-10) dos sobrenadantes de cultura, foram  
371 analisadas por técnica de *Cytometric Bead Array* – CBA. O Plasma foi separado  
372 para análise dos níveis de anticorpos específicos anti-Toxina Tetânica (IgG total e  
373 subclasses IgG1, IgG2, IgG3), pela técnica de ELISA indireto. **Resultados:** Os  
374 resultados mostraram que as crianças com IRR e as do grupo controle, apresentam  
375 capacidade semelhante de resposta de citocinas induzidas por LPS, assim como de  
376 produção de anticorpos para antígenos T dependente. Chamou atenção a menor  
377 produção de IL-1 $\beta$ , em culturas não estimuladas, pelo grupo de crianças com IRR e  
378 também a menor produção de IL-8 por PBMCs de crianças com IRR após estímulo.  
379 **Conclusão:** A menor produção de IL-1 $\beta$  sugere que este grupo pode apresentar  
380 uma ativação basal menor, e que isso pode estar influenciando em sua capacidade  
381 e velocidade de resposta inflamatória, e que a menor produção de IL-8 pode ter sido

27  
28

382 modulada pela IL-10, fazendo com que esse grupo responda com menos danos aos  
383 tecidos e com melhor prognóstico.

384 **Palavras-chave:** Resposta imune inflamatória; Resposta imune humoral; Infecção  
385 Respiratória Recorrente; infância.

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

29  
30

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

## **ABSTRACT**

432

## ABSTRACT

433

434 **Background:** Transient and partial deficiencies in the immune response in childhood  
435 may be associated with increased susceptibility to respiratory infections and their  
436 relative frequency. Understanding the ability of the immune system to react in its  
437 different compartments is important for a better understanding of the mechanisms  
438 that are directly involved in the susceptibility to Recurrent Respiratory Infections  
439 (RRI) presented in childhood, until they reach immunological maturity. **Objectives:**  
440 To analyze the Inflammatory and Humoral Immune Response in children aged 2 to 6  
441 years with Recurrent Respiratory Infections. **Material and methods:** Peripheral  
442 blood samples (5mL) were collected, obtained by venipuncture, from children  
443 between 2 and 6 years of age treated at the general pediatric outpatient clinic of the  
444 Universidade Federal Triângulo Mineiro (UFTM). Of the samples collected, 36  
445 corresponded to the group of children with Recurrent Respiratory Infections, without  
446 underlying disease to justify them, and 50 to the control group (healthy children, with  
447 no history of Recurrent Respiratory Infections), whose parents accepted to  
448 participate in the study, responding to a questionnaire containing important  
449 information for the same. The mononuclear cells were separated in a Ficcol hypaque  
450 gradient and cultured for 24 hours in the presence of Medium or LPS, and the pro  
451 and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and IL -10) of the culture  
452 supernatants were analyzed using the Cytometric Bead Array – CBA technique.  
453 Plasma was separated for analysis of the levels of specific anti-Tetanus Toxin  
454 antibodies (total IgG and IgG1, IgG2, IgG3 subclasses), by the indirect ELISA  
455 technique. **Results:** The results showed that children with IRR and those in the  
456 control group have a similar capacity to respond to LPS-induced cytokines, as well as  
457 to produce antibodies to T-dependent antigens. Attention was drawn to the lower  
458 production of IL-1 $\beta$  in non-stimulated cultures by the group of children with IRR and  
459 also the lower production of IL-8 by PBMCs of children with IRR after stimulation.  
460 **Conclusion:** The lower production of IL-1 $\beta$  suggests that this group may have a  
461 lower basal activation, and that this may be influencing their capacity and speed of  
462 inflammatory response, and that the lower production of IL-8 may have been

463 modulated by IL -10, causing this group to respond with less tissue damage and  
464 better prognosis.

465 **Keywords:** Inflammatory immune response; Humoral immune response; Recurrent  
466 Respiratory Infection; childhood.

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

35  
36

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

## **LISTA DE FIGURAS**

## LISTA DE FIGURAS

510

511

512 Figura 1. Gráfico da produção de citocinas IL-1 $\beta$ , por PBMCs de pacientes com IRR e  
513 controles em cultura, após período de 24 horas. \*: p=0,0215, \*\*: p=0,0056, \*\*\*: p=0,0001;  
514 \*p<0,05 - Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test.....53

515 Figura 2. Gráfico da produção de citocinas TNF- $\alpha$ , por PBMCs de pacientes com IRR e  
516 controles em cultura, após período de 24 horas. \*\*\*: p=0,0001, \*\*\*\*: p=0,0001; \*p<0,05 -  
517 Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test.....54

518 Figura 3. Gráfico da produção de citocinas IL-6, por PBMCs de pacientes com IRR e  
519 controles, em cultura, após período de 24 horas. \*\*\*: p=0,0001, \*\*\*\*: p=0,0001; \*p<0,05 -  
520 Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test.....55

521 Figura 4. Gráfico da produção de citocinas IL-8 por PBMCs de pacientes com IRR e  
522 controles, em cultura, após período de 24 horas. \*\*\*: p=0,0001, \*\*\*\*: p=0,0001; \*p<0,05 -  
523 Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test.....56

524 Figura 5. Gráfico da produção de citocinas IL-10 em PBMCs de pacientes com IRR e  
525 controles, em cultura, após período de 24 horas.. \*\*\*\*: p=0,0001, \*\*\*\*: p=0,0001; \*p<0,05 -  
526 Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test.....57

527 Figura 6. Gráfico dos resultados da detecção de anticorpos IgG total (IgG anti- TT) no  
528 plasma de crianças com IRR e controles pela técnica de ELISA indireto; \*p<0,05 -.Mann-  
529 Whitney Test.....58

530 Figura 7. Gráfico da concentração das subclasses de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 no  
531 plasma de crianças com IRR e controles pela técnica de ELISA indireto; \*p<0,05 - Mann-  
532 Whitney Test, Wilcoxon Test.....59

533 Figura 8. Gráfico da concentração de anticorpos IgG total no plasma de crianças com IRR e  
534 controles relacionado à idade; Teste não paramétrico de Spearman.....59

535

536

537

538

39  
40

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

## **LISTA DE TABELAS**

564

565

41  
42

## LISTA DE TABELAS

566

567

568 Tabela 1. Número de amostras coletadas distribuídas entre testes e controles. .... 44

569 Tabela 2. Número de amostras coletadas, selecionadas após processamento e análise,  
570 distribuídas entre testes e controles. ....44

571 Tabela 3. Distribuição do número de crianças que constituíram o grupo teste, conforme os  
572 tipos de IRR, definidas de acordo com a clínica que apresentaram. .... 52

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

43  
44

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

602

603

604

605

606

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

607

608	%	Por cento
609	µg	Micrograma
610	µL	Microlitro
611	BSA	Bovine sérum albumin
612	CBA	Técnica de CytometricBeadArray
613	CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
614	DCs	Células Dendríticas
615	EDTA	ÁcidoEtilenodiaminotetracético
616	ELISA	Ensaio Imunoenzimático
617	FAG	Fagocitose
618	FMN	Fagócitos mononucleares
619	FRRI	Infecções Respiratórias Recorrentes Frequentes
620	<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
621	HRP	Horseradish Peroxidase
622	IA	Imunidade Adaptativa
623	IAV	Vírus Influenza A
624	IFN- α	Interferon-α
625	IFN- β	Interferon-β
626	IFN- γ	Interferon γ
627	IgA	Imunoglobulina tipo A
628	IgD	Imunoglobulina tipo D
629	IgE	Imunoglobulina tipo E
630	IgG	Imunoglobulina tipo G

631	IgG 1	Subclasse de Imunoglobulina tipo 1
632	IgG 2	Subclasse de Imunoglobulina tipo 2
633	IgG 3	Subclasse de Imunoglobulina tipo 3
634	II	Imunidade Inata
635	IL-10	Interleucina 10
636	IL-12	Interleucina 12
637	IL-16	Interleucina 16
638	IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
639	IL-4	Interleucina 4
640	IL-6	Interleucina 6
641	IL-8	Interleucina 8
642	ILCs	Células Linfóides Inatas
643	IR	Infecção Respiratória
644	IRA	Infecção Respiratória Aguda
645	IRR	Infecção Respiratória Recorrente
646	ITRR	Infecções do Trato Respiratório Recorrente
647	IVAS	Infecção das Vias Aéreas Superiores
648	LPS	Lipopolissacarídeo
649	M	Molar
650	<i>M. pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
651	ml	Mililitro
652	mM	Milimolar
653	M $\Phi$	Macrófagos
654	NK	Células Natural Killer

655	Nm	Nanômetro
656	°C	Graus Celsius
657	OMA	Otite Média Aguda
658	OMS	Organização Mundial de Saúde
659	OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
660	PBMC	Célula Mononuclear de Sangue Periférico
661	PBS	Phosphate-Buffered Saline
662	PE	Ficoeritrina
663	Pg	Picograma
664	Ph	Potencial Hidrogeniônico
665	RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and
666		Secreted
667	RI	Resposta Imune
668	RIA	Resposta Imune Adaptativa
669	RII	Resposta Imune Inata
670	ROI	Intermediários Reativos de Oxigênio
671	ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
672	RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium – Meio de
673		Cultura
674	RSV	Vírus Sincicial Respiratório
675	RSVh	Vírus Sincicial Respiratório Humano
676	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
677	<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
678	SI	Sistema Imunológico
679	SIH	Sistema Imune Humoral

51  
52

680	TGF- $\beta$	Fator Transformador de Crescimento- $\beta$
681	TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
682	TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
683	TT	Toxina Tetânica
684	UFTM	Universidade Federal do Triangulo Mineiro
685	VNR	Rinovírus
686	Xg	Força Gravitacional

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

53  
54

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

## **SUMÁRIO**

## Sumário

732  
733

734	1. INTRODUÇÃO	29
735	<b>1.1. Sistema Imune</b>	29
736	<b>1.2. Resposta Imune e a Idade</b>	31
737	<b>1.3. Mecanismos de Defesa do Aparelho Respiratório</b>	32
738	<b>1.4. Infecções Respiratórias na Infância</b>	32
739	<b>1.5. Infecções Respiratórias Recorrente na Infância</b>	34
740	2. HIPÓTESE	39
741	3. OBJETIVOS GERAIS	41
742	<b>3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	41
743	3.1.1.	41
744	3.1.2.	41
745	4. METODOLOGIA	43
746	<b>4.1. AMOSTRAS</b>	43
747	<b>4.1.1. COLETA DE AMOSTRAS</b>	43
748	<b>4.1.2. NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS</b>	43
749	<b>4.1.3. CRITÉRIO DE INCLUSÃO</b>	44
750	<b>4.1.4. CRITÉRIO DE EXCLUSÃO</b>	45
751	<b>4.2. PROCEDIMENTO TÉCNICO PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS</b>	45
752	<b>4.2.1. SEPARAÇÃO DO PLASMA E PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS</b>	
753	<b>MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)</b>	45
754	<b>4.2.2. ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA</b>	46
755	<b>4.2.3. ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL</b>	47
756	<b>4.3. ANÁLISE DE DADOS / ESTATÍSTICA</b>	49
757	5. RESULTADOS	51
758	<b>5.1. Dados Clínicos e Demográficos</b>	51
759	<b>5.2. Análise de Citocinas</b>	52
760	<b>5.2.1. Produção de Citocinas Pró e Anti-Inflamatórias</b>	52
761	<b>5.3 Análise dos Anticorpos</b>	57
762	<b>5.3.1. Detecção de Anticorpos IgG total e subclasses de IgG Anti-toxina Tetânica</b>	
763	<b>(IgG total e IgG1, IgG2, IgG3 anti TT)</b>	57
764	6. DISCUSSÃO	61
765	7. CONCLUSÃO	72
766	8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	73
767	9. VANTAGENS DO ESTUDO	73

57  
58

768	REFERÊNCIAS.....	75
769		
770	ANEXO 1 .....	82
771	ANEXO 2 .....	83
772	ANEXO 3 .....	84
773	ANEXO 4 .....	85
774		
775		
776		
777		
778		
779		
780		
781		
782		
783		
784		
785		
786		
787		
788		
789		
790		
791		
792		
793		
794		
795		

59  
60

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

## **INTRODUÇÃO**

## 811 1. INTRODUÇÃO

812

### 813 1.1. Sistema Imune

814

815 O sistema Imune (SI) é responsável por um amplo espectro de eventos  
816 fisiológicos voltados para a manutenção da homeostase do organismo, e dentre  
817 eles, os mecanismos de defesa, gerado pelo organismo contra o agente invasor. É  
818 composto por estruturas e processos biológicos fundamentais na manutenção da  
819 homeostase tecidual e integridade do mesmo, além de ser essencial na proteção do  
820 organismo contra doenças (SATTLER, 2017).

821 É função do SI defender o organismo contra agentes infecciosos, neutralizar  
822 toxinas, eliminar células neoplásicas, reparar tecidos, e para isso se utiliza de  
823 mecanismos pró e anti-inflamatórios, também conhecidos como Resposta Imune,  
824 que vão modular a intensidade, o tempo e a natureza dessas respostas (CONDINO-  
825 NETO, 2014). Ela envolve uma interação regulada de forma estrita entre as células  
826 apresentadoras de antígenos e os linfócitos T e B, que facilitam as vias efetoras  
827 imunológicas específicas do patógeno, a geração de memória imunológica e a  
828 regulação da homeostase imune do hospedeiro (BONILLA *et al.*, 2010).

829 Integram os mecanismos de defesa gerado pelo organismo, contra o agente  
830 invasor, os mecanismos imunológicos inespecíficos ou Resposta Imune Inata, e os  
831 mecanismos imunológicos específicos ou Resposta Imune Adaptativa (FULGINITI *et*  
832 *al.*, 1980; JANEWAY *et al.*, 1994; SORENSEN *et al.*, 1994).

833 A Resposta imune inata (RII), primeira linha de defesa do organismo após  
834 exposição a um agente infeccioso ou patógeno, é ativada independente do contato  
835 prévio com antígenos. Constituída por barreiras epiteliais (pele e mucosas), células  
836 (neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células natural killer),  
837 citocinas e fatores humorais (proteínas do sistema complemento) (CLAPP, 2006).  
838 Uma das principais funções dessa resposta é o recrutamento de mais e mais células  
839 fagocíticas e moléculas efetoras para o local de infecção, que ocorre através da

840 liberação de citocinas e de mediadores inflamatórios produzidos  
841 principalmente por monócitos e macrófagos ativados.

842 Macrófagos ativados, podem produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ ,  
843 IL-1 $\beta$  e IL-6, que aumentam a Resposta Inflamatória, citocinas anti-inflamatórias  
844 como IL-10 e TGF- $\beta$ , contrabalanceando o excesso de resposta, e também podem  
845 produzir quimiocinas como IL-8 E MCP-1 que ativam e promovem a migração de  
846 neutrófilos para o local da infecção (AZIZ *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 1998).

847 A Resposta imune adaptativa (RIA) ou específica, é a segunda resposta  
848 apresentada pelo organismo após a invasão do patógeno, composta por células  
849 como Linfócitos B e Linfócitos T, e por citocinas. É ativada após a apresentação de  
850 componentes antigênicos do microrganismo por células apresentadoras de  
851 antígenos (macrófagos, células dendríticas) aos linfócitos T, e após ligação dos  
852 antígenos às imunoglobulinas de superfície dos linfócitos B. (KNIGHT *et al.*, 1993;  
853 ABBAS *et al.*, 1994).

854 Linfócitos B ativados (LB), entram em processo de expansão clonal,  
855 diferenciam-se em plasmócitos e produzem anticorpos, caracterizando a Imunidade  
856 Humoral. Linfócitos T (LT) ativados, também passam por uma fase inicial de  
857 expansão clonal, e vão se diferenciar em células T efectoras. Os LT auxiliares  
858 produzirão citocinas que vão modular a imunidade, enquanto que os LT citóxicos,  
859 irão induzir a morte celular programada (apoptose) nas células alvo. A produção de  
860 diferentes citocinas pelas células T auxiliares poderá permitir sua classificação em  
861 grupos funcionais distintos, por exemplo os padrões Th1 (IL-2, TNF-ALFA, IFN-  
862 GAMA), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), Th17 (IL-17) entre outros. (HOLT *et al.*, 2000;  
863 JACOB *et al.*, 2010).

864 Citocinas são moléculas polipeptídicas solúveis de baixo peso molecular, na  
865 maioria glicosiladas, produzidas por uma grande variedade de células, e dentre elas  
866 se destacam: monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, linfócitos T e B,  
867 células endoteliais, queratinócitos, células musculares lisas, células do parênquima  
868 gastrointestinal e do estroma endometrial, além de células neoplásicas (SOUBA,  
869 1994; ROITT, *et al.*, 1996). Juntas, elas criam um contexto imunoinflamatório que  
870 gera amplificação de resposta e recrutamento de células, capazes de interferir em

871 toda a resposta imune, e sua deficiência pode acarretar problemas em toda a  
872 imunidade (JACOB, *et al.*, 2010; OFER, 2007; ADKINS, *et al.*, 2004).

873

## 874 **1.2. Resposta Imune e a Idade**

875

876 Já foi demonstrado que alguns fatores podem interferir na resposta imune,  
877 tornando-a menos eficaz, como por exemplo, a idade, fatores ambientais, fatores  
878 genéticos, fatores anatômicos, fatores fisiológicos, fatores metabólicos e fatores  
879 microbianos, e a interação adequada destes diferentes mecanismos de defesa  
880 podem levar ao controle ou eliminação das infecções (FULGINITI, *et al.*, 1980;  
881 JANEWAY, *et al.*, 1994; SORENSEN, *et al.*, 1994).

882 No que tange o fator idade, durante a gestação, os anticorpos que o feto  
883 apresenta, são anticorpos transferidos de sua mãe através da placenta.  
884 Normalmente essa transferência acontece em grande quantidade, a partir do terceiro  
885 trimestre de gestação, principalmente os da classe IgG (Imunoglobulina G),  
886 representando todo o repertório imunológico fetal. Após o nascimento, os níveis de  
887 anticorpos maternos transferidos caem gradativamente até por volta do sexto mês  
888 de idade, ocorrendo simultaneamente, o desenvolvimento e a maturação do sistema  
889 imune da criança durante a infância e adolescência (CONDINO-NETO, 2014).

890 Sabe-se que, na fase inicial da vida, o sistema imunológico apresenta  
891 habilidade limitada em montar uma resposta imune efetiva, do ponto de vista  
892 quantitativo e qualitativo contra patógenos invasivos, e seu desenvolvimento  
893 imunológico somente estará completo na infância tardia, implicando assim em maior  
894 suscetibilidade às infecções durante essa fase. (HOLT, *et al.*, 2000).

895 A amamentação no período inicial da vida é de grande importância, pois o  
896 leite materno, que é alimento rico, perfeito, completo e fonte de grande quantidade  
897 de anticorpos e células do sistema imunológico, contribui fundamentalmente para a  
898 proteção da criança contra infecções graves nesse período (CONDINO-NETO,  
899 2014).

900 Segundo LAMBERT E CULLEY (2017), no início da vida, é que se encontra o  
901 período de maior suscetibilidade às infecções respiratórias (IR), inclusive com  
902 sintomas frequentemente mais graves em neonatos do que nos adultos. Nessa fase,  
903 o sistema imune é considerado ineficiente na maioria dos compartimentos; as  
904 respostas aos estímulos inatos são fracas, as células apresentadoras de antígenos  
905 têm pouca atividade imunoestimuladora e as respostas adaptativas dos linfócitos são  
906 limitadas, levando a uma fraca memória imunológica e algumas respostas vacinais  
907 ineficazes. Somente com o desenvolvimento e a idade esse quadro poderá ser  
908 modificado.

909

### 910 **1.3. Mecanismos de Defesa do Aparelho Respiratório**

911

912 No aparelho respiratório, esses mecanismos de defesa envolvem uma série  
913 de fatores que atuam na remoção de partículas inaladas e micro-organismos, e a  
914 barreira mecânica é o primeiro mecanismo de defesa, que junto com o sistema  
915 imunológico, atua com o objetivo de proteger os pulmões contra as infecções  
916 (LOPES AJ, *et al.*, 2010).

917 O SI, ao longo das vias aéreas, ao ativar os componentes da primeira linha de  
918 defesa (defesa natural), os quais atuam de forma imediata, o fazem tentando  
919 dificultar a chegada de microrganismos às porções mais profundas dos pulmões,  
920 além de tentar retardar ao máximo a instalação de alguma reação inflamatória que  
921 possa ser potencialmente danosa às estruturas mais nobres do próprio órgão. Numa  
922 segunda linha, estão os mecanismos de defesa adquiridos, que envolvem respostas  
923 imunológicas mediadas por linfócitos. Estes são capazes de deter o agente  
924 agressor, porém também podem levar a consequências danosas, na dependência  
925 de sua intensidade e natureza. Assim, a imunidade, seja ela a inata ou a adaptativa,  
926 é necessária à sobrevivência do hospedeiro, mas também tem o potencial de causar  
927 lesão (MOREIRA *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2005; MASTEN 2004).

928

#### 929 **1.4. Infecções Respiratórias na Infância**

930

931 Com a inabilidade de resposta pertinente à idade, também conhecida como  
932 imaturidade imunofisiológica, e com uma maior suscetibilidade às infecções  
933 respiratórias, na infância as doenças respiratórias acabam se apresentando com  
934 grande frequência. Elas abrangem um amplo espectro de eventos mórbidos de  
935 diferentes etiologias e de distinta gravidade que, em comum, caracterizam-se por  
936 comprometer uma ou mais porções do trato respiratório da criança (BENICIO, *et al.*,  
937 2000).

938 As doenças respiratórias estão entre as principais causas de internação  
939 hospitalar de crianças, e a frequência dessas internações as deixam mais  
940 suscetíveis ao desenvolvimento de doenças respiratórias graves (BEBER, *et al.*,  
941 2020). Desde 1995, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declara que grande  
942 parte das crianças brasileiras apresentam cerca de quatro a seis infecções  
943 respiratórias agudas (IRAs) por ano, impactando diretamente na saúde pública.

944 As IRAs são responsáveis por 30 a 60% das consultas ambulatoriais e  
945 importante causa de hospitalização na infância (GRAHAM, 1991; PIO *et al.*, 1984), e  
946 em alguns locais considerada a principal responsável por 6,7 a 10,2% das  
947 internações (CHATKIN *et al.*, 1987; VICTORA *et al.*, 1988). No Brasil, a pneumonia  
948 foi a principal causa de mortalidade em menores de cinco anos entre 1985 e 1990,  
949 apresentando taxa muito maior do que a observada, por exemplo, nos Estados  
950 Unidos no mesmo período (ANTUÑANO, 1997), e em 2011, foram notificados 2.435  
951 óbitos por Infecções Respiratórias Agudas (IRA) em crianças, sendo o maior número  
952 de notificações no estado de São Paulo, com 454 óbitos e menor índice de  
953 mortalidade notificada no estado de Roraima com 16 óbitos (DATASUS, 2011).

954 Os episódios de IRAs na infância também podem variar de acordo com a  
955 idade, e sendo assim, crianças de seis meses aos três anos podem apresentar de  
956 seis a nove infecções respiratórias agudas por ano, porém 10% delas apresentam  
957 mais de dez quadros ao ano. De três a cinco anos, o número de infecções  
958 respiratórias pode diminuir para três a quatro por ano, e crianças acima dos cinco  
959 anos podem apresentar um a dois quadros por ano, como ocorre nos adultos. Esse

960 é um comportamento fisiológico decorrente do desenvolvimento do sistema  
961 imunológico, e entre os fatores de risco que podem aumentar a frequência de  
962 infecções virais do aparelho respiratório, podemos citar a permanência em berçários  
963 e creches, o contato com irmãos mais velhos e a ausência de aleitamento materno  
964 (SILVA, 2015).

965

### 966 **1.5. Infecção Respiratória Recorrente na infância (IRR)**

967

968 Crianças com Infecções do Trato Respiratório Recorrentes (ITRR), será  
969 considerada saudável, sempre na ausência de qualquer condição patológica  
970 subjacente que possa justificar a recorrência das infecções (PRINCIPI N, *et al.*,  
971 2003). Essas infecções recorrentes na infância, em geral, não estão associadas a  
972 falhas na resposta imunológica, mas refletem imaturidade imunológica e maior  
973 exposição a microrganismos infecciosos durante os primeiros anos de vida (de  
974 MARTINO, *et al.*, 2007).

975 Os principais agentes etiológicos causadores das ITRR são: Vírus Sincicial  
976 Respiratório (RSV), Rinovírus (VSR) e Influenza (IAV), além de *Streptococcus*  
977 *pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus*  
978 *pyogenes* (PRINCIPI, *et al.*, 2003); e diferentes patógenos podem estimular  
979 predominantemente um ou outro mecanismo de defesa, como por exemplo, as  
980 bactérias extracelulares e vírus o sistema complemento, anticorpos e fagocitose;  
981 bactérias intracelulares, fungos e parasitas os linfócitos T, monócitos e macrófagos;  
982 vírus as células “*natural killer*”(NK), linfócitos T citotóxicos, toxinas e anticorpos  
983 (CARVALHO, *et al.*, 1998).

984 SCHAAD e colaboradores (2016), em um estudo sobre o diagnóstico e  
985 manejo de crianças com infecções respiratórias recorrentes, mostrou que definido o  
986 diagnóstico de infecção respiratória em crianças, e descartando causas de doenças  
987 crônicas, imunodeficiências, e outros diagnósticos, elas deveriam ser inseridas no  
988 grupo de crianças portadoras de infecções respiratórias. E seriam incluídas no grupo  
989 de crianças portadoras de infecções respiratórias recorrentes as menores de 3 anos

990 que apresentassem mais que oito episódios por ano, e as maiores de 3 anos que  
991 apresentassem mais de 6 episódios por ano.

992 Episódios de IRR em crianças, foram associados a mecanismos que  
993 cooperam na regulação da resposta da barreira respiratória, contra o ataque do  
994 *Vírus Influenza A* e *Streptococcus pneumoniae* e, segundo os autores, as barreiras  
995 físicas e celulares da superfície mucosa do trato respiratório, utilizam uma  
996 variedade de estratégias para conter a entrada de microrganismos. Eles mostram  
997 que, patógenos como *Vírus influenza* e *Streptococcus pneumoniae* requerem  
998 células hospedeiras para sua replicação e disseminação e acabam se instalando no  
999 trato respiratório, causando graves danos ao hospedeiro durante sua invasão (Le  
1000 MESSURIER, *et al.*, 2020).

1001 Em análise realizada nas secreções das vias aéreas de crianças infectadas  
1002 com o Vírus Sincicial Respiratório (RSV), foram encontrados efeitos antibacterianos  
1003 incidentais. Observou-se uma atividade antibacteriana significativamente maior  
1004 nessas crianças em comparação aos controles negativos. Segundo os autores, a  
1005 infecção por RSV está associada ao influxo de neutrófilos e de degranulação nas  
1006 vias aéreas, marcada pelo aumento na expressão de proteínas com atividade  
1007 antibacteriana conhecida. Nesse caso, o organismo parece desenvolver um  
1008 mecanismo regulatório modulando o crescimento bacteriano nas vias aéreas  
1009 dessas crianças infectadas (SANDE *et al.*, 2019).

1010 Outro estudo também realizado em crianças que apresentavam IRR, com o  
1011 objetivo de avaliar desvios imunológicos em exames laboratoriais, analisaram  
1012 crianças através de amostras de sangue periférico. Algumas apresentaram número  
1013 reduzido de células B, e outras, de células T, incluindo diminuição de TCD4, bem  
1014 como de células T CD8 positivas. Além disso, avaliaram os granulócitos, que  
1015 apresentaram atividade qranulocítica diminuída. Eles concluíram que a IRR do trato  
1016 respiratório poderia estar associada a resposta inadequada de neutrófilos a  
1017 patógenos (RANISZEWSKA *et al.*, 2015).

1018 DON e colaboradores (2007), ao avaliarem fagocitose em crianças com IRR,  
1019 perceberam que as deficiências na fagocitose (FAG) e na produção de  
1020 intermediários reativos de oxigênio (ROS) de neutrófilos polimorfonucleares  
1021 poderiam estar associados a gênese das IRR na infância, e esses dados foram

1022 confirmados por CALAPODOPULUS e colaboradores (2018), ao analisarem  
1023 espécies reativas de oxigênio (ROS) em crianças de 2 a 6 anos de idade com IRR,  
1024 também associou a diminuição de intermediários de oxigênio a essas crianças.

1025 A proteção imunológica mediada pelos fagócitos mononucleares (FMN) pode  
1026 ser comprometida durante a infecção pelo Vírus Influenza A (IAV), quando as células  
1027 também são alvo do vírus, levando a respostas de citocinas prejudicadas e  
1028 interações alteradas com outras células imunológicas. Além disso, está se tornando  
1029 cada vez mais claro que as células do sistema imune diferem, dependendo da  
1030 localização anatômica onde se espera que elas exerçam sua função (VANGETI S, *et*  
1031 *al.*, 2018).

1032 Crianças pequenas são muito suscetíveis a complicações graves por vírus  
1033 respiratórios, e embora os mecanismos subjacentes permaneçam desconhecidos,  
1034 estudos recentes mostram que a resposta de Células T nos pulmões é importante  
1035 como resposta protetora nas infecções respiratórias, mas foi demonstrado que a  
1036 resposta imune nas vias aéreas está associada também à gravidade da doença.  
1037 Eles dizem ainda que estudos futuros devem se concentrar nos fatores relacionados  
1038 aos vírus e nos fatores ligados aos danos pulmonares, resultantes da resposta  
1039 mediada por células T CD8+ independente do efeito citopático direto ou das  
1040 citocinas pró-inflamatórias secretadas (CONNORS, *et al.*, 2016).

1041 Parcela significativa de crianças com infecções recorrentes também  
1042 apresentam anormalidades no sistema imunológico humoral (SIH). Isso foi mostrado  
1043 há várias décadas, que deficiências seletivas de subclasses de imunoglobulina G em  
1044 pacientes com infecções pulmonares piogênicas poderiam ser encontradas, e que  
1045 consequências a longo prazo poderiam ocorrer, devido a infecções recorrentes do  
1046 trato respiratório inferior, o que levaria a problemas crônicos significativos, como o  
1047 aparecimento de bronquiectasias ou resistência a antibióticos. A investigação de  
1048 crianças com infecções recorrentes do trato respiratório inferior identificou, em pelo  
1049 menos 90% dos casos, uma causa subjacente (SCHUR *et al.*, 1970; POSFAY-  
1050 BARBE *et al.*, 2005; OWAYED *et al.*, 2000).

1051 A imaturidade do sistema imunológico humoral em neonatos e lactentes está  
1052 associado à capacidade reduzida de sintetizar e liberar imunoglobulinas; os níveis  
1053 reduzidos de imunoglobulina são observados em crianças menores que apresentam  
1054 RRTIs (de BAETS *et al.*, 1992), e estudos recentes demonstraram que a deficiência

1055 específica de anticorpos é comum em crianças com infecções respiratórias  
1056 recorrentes; mas muitas vezes é transitória e resolve por si só em poucos anos sem  
1057 tratamento específico (RUUSKANEN *et al.*, 2013; BOYLE *et al.*, 2006).

1058 Com a idade de 2 anos, a criança já apresenta o compartimento das células B  
1059 de memória bem estabelecido, mas o baixo nível de anticorpos pode predispor-las a  
1060 infecções recorrentes, especialmente na ausência de revacinação (SIEBERT *et al.*,  
1061 2013). O uso de vacinas de forma mais ampla, introduzido desde o início do século  
1062 passado, tem contribuído de forma inequívoca para a redução da incidência das  
1063 doenças infecciosas, portanto tão importante quanto a vacinação no início da vida  
1064 são os reforços necessários para manutenção das respostas específicas que o  
1065 organismo pode desenvolver a partir delas (SCHTZMAYR, 2003).

1066 Estudo que avaliou os marcadores celular imune periférico em crianças com  
1067 infecções respiratórias recorrentes na ausência de imunodeficiência primária,  
1068 mostrou que não havia alterações nos níveis de imunoglobulinas séricas em 70%  
1069 das crianças, porém, revelou mudanças na população de células periféricas.  
1070 Encontraram uma diminuição na concentração de linfócitos TCD8+ e nos  
1071 percentuais totais de células B, além de um aumento no número de células B de  
1072 memória. (MUNTEANU *et al.*, 2019).

1073 Em pacientes sem recorrência, um aumento na liberação de IFN- $\gamma$  e IL-12,  
1074 juntamente com níveis reduzidos de IL-4 e IL-10, mostraram uma distorção nas  
1075 respostas do tipo Th1; no acompanhamento, essas citocinas atingiram valores  
1076 normais. Como conclusão, os autores observaram que os níveis anormais de todos  
1077 os parâmetros examinados em crianças com FRRl pode refletir na persistência de  
1078 um microambiente inflamatório nas vias aéreas e uma ativação do sistema  
1079 imunológico, que podem contribuir para a recorrência frequente das doenças  
1080 respiratórias (MALAPONTE G, *et al.*, 2004).

1081 Saber de que maneira os fatores imunológicos podem estar associados ao  
1082 aumento da susceptibilidade às infecções respiratórias torna-se extremamente  
1083 importante. O papel e a frequência relativa dessas deficiências fisiológicas parciais  
1084 no aumento da susceptibilidade as infecções respiratórias ainda são mal  
1085 compreendidos. Também não se sabe como a presença combinada de vários

1086 déficits imunológicos “parciais” podem contribuir para aumentar a susceptibilidade à  
1087 infecção.

1088 O equilíbrio da resposta imune em suas propriedades de reação e de controle  
1089 para uma efetiva resposta de proteção com o menor dano possível aos tecidos é  
1090 dado por diferentes mecanismos regulatórios, em muitos aspectos redundantes e/ou  
1091 reguladores negativos. Baseado nesses conceitos e com o intuito de contribuir para  
1092 o conhecimento dos mecanismos que estão diretamente ligados a suscetibilidade às  
1093 IRR da infância, apresentamos o presente estudo.

1094

1095

1096

1097

1098

1099

1100

1101

1102

1103

1104

1105

1106

1107

1108

1109

1110

1111

1112

1113

1114

1115

1116

1117

1118

1119

**HIPÓTESE**

1120

1121

1122

1123

1124

1125 **2. HIPÓTESE**

1126

1127           Existe correlação entre as respostas imune inflamatória e humoral com a  
1128 incidência de infecções respiratórias recorrentes em crianças de 2 a 6 de idade.

1129

1130

1131

1132

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

1144

1145

1146

1147

1148

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166

1167

1168

1169

1170

## **OBJETIVOS**

1171 **3. OBJETIVOS GERAIS**

1172

1173 Analisar a resposta imune inflamatória e a resposta imune humoral em crianças  
1174 de 2 a 6 anos de idade, com episódios de infecções respiratórias recorrentes.

1175

1176 **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1177

1178 3.1.1. Analisar a resposta imune inflamatória através da produção de citocinas pró e  
1179 anti-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10), em cultura de PBMCs de crianças  
1180 de 2 a 6 anos de idade, com infecções respiratórias recorrentes e controles.

1181

1182 3.1.2. Analisar a resposta imune humoral através da dosagem de anticorpos IgG e  
1183 subclasses de anticorpos (IgG1, IgG2, IgG3) antitoxina tetânica, no plasma de  
1184 crianças de 2 a 6 anos de idade, com infecções respiratórias recorrentes e controles.

1185

1186

1187

1188

1189

1190

1191

1192

1193

1194

1195

1196

1197

1198

1199

1200

1201

1202

1203

1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

1211

1212

1213

## **METODOLOGIA**

1214

1215

1216

1217

## 1218 4. METODOLOGIA

1219

### 1220 4.1. AMOSTRAS

1221

1222 Foram coletadas amostras de sangue de crianças entre 2 a 6 anos de idade  
1223 atendidas no ambulatório de pediatria geral da UFTM, no período de fevereiro a abril  
1224 de 2018, com ausência de sinais e sintomas clínicos, sugestivos de Doenças  
1225 Crônicas, cujos pais aceitaram a participação no estudo, se prontificando a  
1226 responder a um questionário contendo informações acerca de antecedentes  
1227 obstétricos, familiares, mórbidos, nutricionais, hábitos e condições de vida e histórico  
1228 vacinal da criança. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob o  
1229 número 61396916.0.0000.5154.

1230

#### 1231 4.1.1. COLETA DE AMOSTRAS

1232

1233 Foi coletado sangue periférico através de punção venosa, utilizando tubo de 5  
1234 ml com EDTA para posterior separação do plasma e isolamento de células  
1235 mononucleares utilizados em análises futuras.

1236

#### 1237 4.1.2. NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS

1238

1239 Do total de amostras coletadas (113), 50 (44,25%) eram crianças do sexo  
1240 feminino e 63 (55,75%) do sexo masculino. O grupo teste foi composto por 47  
1241 crianças, sendo 22 (46,8%) do sexo feminino e 25 (53,2%) do sexo masculino.  
1242 Enquanto o grupo controle foi composto por 66 crianças, sendo 28 (42,4%) do sexo  
1243 feminino e 38 (57,6%) do sexo masculino (Tabela 1).

1244

1245

Tabela 1. Número de amostras coletadas distribuídas entre testes e controles.

1246

1247

1248

1249

	<b>Sexo feminino</b>	<b>Sexo masculino</b>
<b>Amostras (113)</b>	50 (44,25%)	63 (55,75%)
<b>Testes (47)</b>	22 (46,8%)	25 (53,2%)
<b>Controles (66)</b>	28 (42,4%)	38 (57,6%)

1250

Fonte: Autor,2021

1251

1252

1253

1254

1255

1256

Após coleta, processamento e análise das amostras foram selecionados 86 das 113 inicialmente coletadas, devido as demais (27 amostras) apresentarem dados incompletos ou quantidade de amostra insuficiente à realização de todas as análises propostas. Das amostras selecionadas, 36 eram do grupo teste (18 do sexo feminino e 18 do sexo masculino) e 50 do grupo controle (20 do sexo feminino e 30 do sexo masculino) (Tabela 2).

1257

Tabela 2. Número de amostras coletadas, selecionadas após processamento e análise, distribuídas entre testes e controles.

	<b>Sexo feminino</b>	<b>Sexo masculino</b>
<b>Amostras (86)</b>	38 (44,19%)	48 (55,81%)
<b>Testes (36)</b>	18 (50%)	18 (50%)
<b>Controles (50)</b>	20(40%)	30 (60%)

1258

Fonte: Autor,2021

1259

### 1260 4.1.3. CRITÉRIO DE INCLUSÃO

1261

1262

1263

1264

1265

1266

Como diagnóstico das infecções respiratórias de repetição em geral, foram utilizados os seguintes critérios: 6 ou mais infecções respiratórias por ano; 1 ou mais infecção respiratória por mês, envolvendo vias aéreas superiores, de setembro a abril ou 3 ou mais infecções respiratórias por ano envolvendo as vias aéreas inferiores (RAO *et al.*, 2016).

1267 Para a determinação de crianças hígdas foram usados critérios  
1268 predominantemente clínicos aplicados pelo pediatra nos acompanhamentos de  
1269 rotina (prontuários) e o questionário especificamente desenvolvido para este estudo,  
1270 respondido pelos pais ou responsável legal da criança.

1271

#### 1272 **4.1.4. CRITÉRIO DE EXCLUSÃO**

1273

1274 A determinação de crianças com presença de sinais e sintomas clínicos que  
1275 levassem a suspeita de doenças crônicas, como imunodeficiência primária ou  
1276 secundária, fibrose cística, malformações das vias aéreas, síndrome dos cílios  
1277 imóveis.

1278 A determinação de crianças portadoras de doença de base, condições  
1279 alérgicas, patologias crônicas ou imunodeficiências, bem como em uso de  
1280 medicamentos anti-inflamatório e corticoide com menos de 4 semanas e  
1281 imunossupressores com menos de 90 dias da coleta.

1282

## 1283 **4.2. PROCEDIMENTO TÉCNICO PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS**

1284

### 1285 **4.2.1. SEPARAÇÃO DO PLASMA E PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS** 1286 **MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)**

1287

1288 O plasma e as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram  
1289 separados usando um gradiente de densidade Ficoll-Paque (GE Health Care,  
1290 Uppsala, Suécia), um polímero hidrofílico de sacarose indicado para separar  
1291 células de densidade semelhante e tamanho diferente, sem que ocorra dano à  
1292 integridade funcional e morfológica das membranas. Cerca de 5 mL de sangue  
1293 colhido em tubos contendo EDTA foram cuidadosamente colocados sobre 7,5 mL

1294 de uma solução de Ficoll-Hypaque em tubos plásticos cônicos de 15 mL tipo  
1295 Falcon. Os tubos foram centrifugados a 400xg por 30 minutos, a 21°C. Ao final da  
1296 centrifugação coletou-se cerca de 2 mL de plasma, armazenado a -70°C para  
1297 análises posteriores.

1298 O anel de células formado entre o Ficoll e o plasma foi coletado e o excesso de  
1299 Ficoll foi removido, lavando-se as células por três vezes, com meio RPMI incompleto  
1300 (GIBCO-EUA), 400xg, 4°C, 10 minutos.

1301 A quantidade de células foi determinada através de contagem em câmara de  
1302 Neubauer e a amostra foi ajustada com meio RPMI completo, contendo 50mM de  
1303 HEPES (GIBCO, EUA), 5% de soro fetal bovino inativado (EUROBIO, FRANÇA),  
1304 2mM de L-glutamina (GIBCO, EUA), 40µg/mL de gentamicina (ARISTON, BRASIL),  
1305 a fim de se obter uma concentração final de  $2 \times 10^6$ /mL. Todos os procedimentos  
1306 foram realizados em condições estéreis, utilizando-se de capela de fluxo laminar.

1307 Em placa de cultura de 24 poços (CORNING-EUA) foram adicionados 0,5mL da  
1308 ressuspensão de PBMC contendo  $2 \times 10^6$  células/mL. As células foram distribuídas  
1309 em duas condições,

- 1310 • Sem estímulo -  $2 \times 10^6$  células/mL
- 1311 • Com estímulo de LPS -  $2 \times 10^6$  células/mL + 5µg/mL de LPS

1312 As células foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Após, os  
1313 sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -70°C para posterior dosagem de  
1314 citocinas.

1315

#### 1316 **4.2.2. ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA**

1317

##### 1318 **4.2.2.1. Dosagem das citocinas IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-10 pela Técnica de** 1319 **Cytometric Bead Array – CBA**

1320

1321 A dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias foi realizada em  
1322 sobrenadantes de 24 horas.

1323 As citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10, foram dosadas utilizando-se da  
1324 técnica de Cytometric Bead Array - CBA (BD BIOSCIENCES, EUA), conforme  
1325 instruções do fabricante. As amostras e as citocinas recombinantes foram incubadas  
1326 com microesferas, com distintas intensidades de fluorescência conjugadas com um  
1327 anticorpo de captura específico para cada citocina. Em seguida, foram adicionados  
1328 anticorpos específicos para cada citocina conjugados com ficoeritrina (PE). Após  
1329 incubação, as microesferas foram lavadas com solução própria do kit do fabricante e  
1330 analisadas em citômetro FACS Calibur (BD BIOSCIENCES) utilizando o programa  
1331 Cell Quest (BD BIOSCIENCES). As microesferas específicas para cada citocina  
1332 foram separadas por emitirem intensidades diferentes de fluorescência à 660nm e a  
1333 quantidade de citocina conjugada a cada uma delas foi detectada pela intensidade  
1334 de fluorescência emitida à 585nm. Após aquisição dos dados das amostras e  
1335 citocinas recombinantes, estes foram levados ao software FCAP Array 2.0 (Soft  
1336 Flow-EUA) e as concentrações das citocinas calculadas a partir da curva padrão e  
1337 expressas em pg/mL.

1338

### 1339 **4.2.3. ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL**

1340

#### 1341 **4.2.3.1 Pesquisa de anticorpos anti-Toxina Tetânica (IgG anti TT) pela técnica** 1342 **de ELISA indireto.**

1343

1344 Para a pesquisa de anticorpos específicos anti-Toxina Tetânica (IgG anti  
1345 TT), utilizamos o plasma dos pacientes anteriormente armazenado.

1346 Uma placa de 96 poços de fundo chato de alta sensibilidade (NUNC –  
1347 Maxisorp, Rochester, NY, USA) foi sensibilizada com 50  $\mu$ L de antígeno de toxina  
1348 tetânica em tampão carbonato bicarbonato (1 $\mu$ g/mL, pH=9,4) por 18 horas a 4°C.  
1349 Posteriormente, foi lavada 1 vez com PBS/Tween a 0,05% e bloqueada com 200 $\mu$ L

1350 de PBS/Molico5% (4 horas em temperatura ambiente). Após bloqueio, a placa foi  
1351 lavada novamente com PBS/Tween 0,05% 4 vezes, e foram adicionadas à placa  
1352 100µL/poço das respectivas amostras de plasma diluídas em PBS/molico 5%  
1353 (1:400), e incubadas por 2 horas em estufa a 37°C.

1354 Os poços foram então lavados com PBS/Tween a 0,05% 4 vezes e  
1355 posteriormente foram adicionados 100µL/poço do anticorpo anti-IgG humano  
1356 conjugado a peroxidase (HRP) diluído em PBS/Molico5% (1:2000), permanecendo  
1357 por uma hora à temperatura ambiente e subseqüentemente lavando-se com solução  
1358 de PBS/Tween a 0,05% 4 vezes. Após esta etapa, foram pipetados 100 µL/poço do  
1359 Substrato TMB, permanecendo por aproximadamente uma hora à temperatura  
1360 ambiente, até a emissão de cor e posteriormente foi adicionado 100 µL/poço da  
1361 solução de parada (ácido sulfúrico 4M). Os resultados foram obtidos pelas medidas  
1362 das absorvâncias a 450 nm, em leitor automático de ELISA (Enspire, Perkin Elmer,  
1363 EUA). Os dados foram expressos na forma de absorvância.

1364

#### 1365 **4.2.3.2 Pesquisa de subclasses de anticorpos anti-Toxina Tetânica (IgG1, IgG2,** 1366 **IgG3) pela técnica de ELISA indireto.**

1367

1368 Para a pesquisa de subclasses de anticorpos específicos anti-Toxina Tetânica  
1369 (IgG1, IgG2, IgG3), utilizamos o plasma dos pacientes anteriormente armazenado.

1370 Três placas de 96 poços de fundo chato de alta sensibilidade (NUNC –  
1371 Maxisorp, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno de  
1372 toxina tetânica em tampão carbonato bicarbonato (1ug/mL, pH=9,4) por poço,  
1373 deixado por 18 horas a 4°C. Posteriormente, foram lavadas 1 vez com PBS/Tween a  
1374 0,05% e bloqueadas com 200µL de PBS/BSA 2% (4 horas em temperatura  
1375 ambiente). Após bloqueio, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween  
1376 0,05%, 4 vezes, e foram adicionados 100µL/poço das respectivas amostras de  
1377 plasma, diluídas em solução de PBS/BSA 2% (1:20) e incubadas por 2 horas em  
1378 estufa a 37°C.

1379 Os poços foram então lavados com PBS/Tween a 0,05% 4 vezes e

1380 posteriormente foram adicionados 60µL/poço dos respectivos anticorpos  
1381 monoclonais secundários (IgG1, IgG2, IgG3) ligado a biotina, diluídos em solução de  
1382 PBS/BSA2% (1:1000) nas respectivas placas, permanecendo por duas horas à  
1383 temperatura ambiente e subsequentemente lavando-se com solução de PBS/Tween  
1384 0,05% 4 vezes. Após esta etapa, foram pipetados 60µL/poço de estreptoavidina  
1385 conjugado a peroxidase, diluída em solução de PBS/BSA 2% (1:1000),  
1386 permanecendo por duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas  
1387 foram lavadas com PBS/Tween a 0,05% 4 vezes adicionando-se, em seguida,  
1388 100µL/poço do Substrato TMB, permanecendo por aproximadamente uma hora à  
1389 temperatura ambiente, até a emissão de cor e posteriormente foi adicionado  
1390 100µL/poço da solução de parada (ácido sulfúrico 4M). Os resultados foram obtidos  
1391 pelas medidas das absorvâncias a 450nm, em leitor automático de ELISA (Enspire,  
1392 Perkin Elmer, EUA). Os dados foram expressos na forma de absorvância.

1393

#### 1394 **4.3. ANÁLISE DE DADOS / ESTATÍSTICA**

1395

1396 A análise estatística de todos os dados foi realizada utilizando-se o software  
1397 Graph Pad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

1398 Todas as variáveis estudadas não seguiram a distribuição normal, portanto  
1399 para as análises realizadas entre os grupos de Pacientes com IRR e Controles foi  
1400 utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney, enquanto para as análises dentro  
1401 de cada grupo foi utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon.

1402 Além disso, também foi realizado o teste não paramétrico de Spearman para  
1403 correlacionar os de níveis de anticorpos IgG total e a idade das crianças.

1404 Para todos os testes, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados  
1405 estatisticamente significantes.

1406

1407

105  
106

1408

1409

1410

1411

1412

1413

1414

1415

1416

1417

1418

1419

1420

1421

1422

1423

1424

## **RESULTADOS**

1425

1426

1427

1428

## 1429 5. RESULTADOS

1430

### 1431 5.1. Dados Clínicos e Demográficos

1432

1433 Foram coletadas amostras de sangue periférico (5mL), obtidas por punção  
1434 venosa, de 113 crianças entre 2 a 6 anos de idade atendidas no ambulatório de  
1435 pediatria geral da UFTM, no período de fevereiro a abril de 2018, com ausência de  
1436 sinais e sintomas clínicos, sugestivos de Doenças Crônicas. Essas foram divididas  
1437 em dois grupos. O primeiro, definido como “teste”, foi composto por crianças,  
1438 independente de gênero ou etnia, com história de infecções respiratórias  
1439 recorrentes, excluídas patologias de base que justificassem as mesmas (como  
1440 imunodeficiência primária ou secundária, fibrose cística, malformações das vias  
1441 aéreas, síndrome dos cílios imóveis) e cujos pais aceitaram a participação no  
1442 estudo, se prontificando a responder a um questionário contendo informações  
1443 acerca de antecedentes obstétricos, familiares, mórbidos, nutricionais, hábitos e  
1444 condições de vida e histórico vacinal da criança. O segundo grupo, definido como  
1445 “controle”, foi composto por crianças hígdas, sem história de infecções respiratórias  
1446 recorrentes, cujos pais aceitaram a participação no estudo e responderam o mesmo  
1447 questionário, com o objetivo de permitir análise comparativa dos dados entre ambos.  
1448 O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob o número  
1449 61396916.0.0000.5154.

1450 Das amostras coletadas, foram selecionadas 86 crianças e excluídas 27, por  
1451 motivo dessas últimas apresentarem dados incompletos ou amostra insuficiente à  
1452 realização de todas as análises propostas. Destas, 36 (18 sexo feminino e 18 sexo  
1453 masculino) formaram o grupo “teste” e 50 (20 sexo feminino e 30 sexo masculino)  
1454 formaram o grupo “controle”.

1455 As crianças com histórico de IRR apresentaram em média de 6 a 11 episódios  
1456 de infecções, sendo amigdalite a mais frequente (20 crianças), seguida por sinusite  
1457 (10 crianças) e em menores números as que apresentaram Infecção das Vias  
1458 Aéreas Superiores (IVAS), Otite Média Aguda (OMA), laringotraqueobronquite e

1459 pneumonia. Todas elas hígdas, ou seja, não apresentavam doença de base que  
1460 justificassem a recorrência dos quadros, com crescimento e desenvolvimento  
1461 adequados para as idades, e se encontravam bem entre os episódios infecciosos, os  
1462 quais tiveram evolução clínica sem complicações e resposta adequada a terapias  
1463 convencionais, porém, apresentaram maior suscetibilidade a exposição a agentes  
1464 infecciosos (Tabela 3).

1465

Tabela 3. Distribuição do número de crianças que constituíram o grupo teste,  
conforme os tipos de IRR, definidas de acordo com a clínica que apresentaram.

1466

1467

1468

1469

1470

1471

1472

1473

1474

1475

1476

## 1477 **5.2. Análise de Citocinas**

1478

### 1479 **5.2.1. Produção de Citocinas Pró e Anti-Inflamatórias**

1480

1481 A análise da Resposta Imune Inata (RII) através da produção de citocinas pró  
1482 e anti-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10 por PBMCs de crianças com IRR  
1483 e controles, em cultura de 24 horas, apresentou os seguintes resultados:

1484

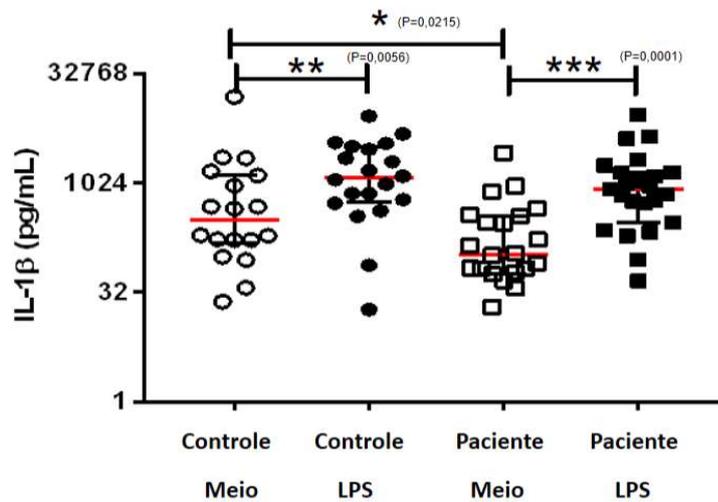
IRR (6-11 EPISÓDIOS)	NÚMERO DE CRIANÇAS
Amigdalite	20 crianças
Sinusite	10 crianças
Outras (Infecção das Vias Aéreas Superiores (IVAS), Otite Média Aguda (OMA), Laringotraqueobronquite e pneumonia).	06 crianças

Fonte: Autor,2021

1485 **5.2.1.1. Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )**

1486

1487 PBMCs de pacientes com IRR quando não estimuladas produziram menos IL-  
1488 1 $\beta$  que PBMCs de crianças do grupo controle também não estimuladas (p=0,0215).  
1489 Após estímulo com LPS, PBMCs de pacientes com IRR e controles produziram IL-1 $\beta$   
1490 de forma semelhante (p=0,2790), porém, após estímulo, tanto as PBMCs de  
1491 pacientes com IRR quanto as do grupo controle produziram mais IL-1 $\beta$  que seus  
1492 pares não estimulados (p=0,0001 e p=0,0056 respectivamente, \*p<0,05 -Mann-  
1493 Whitney Test, Wilcoxon Test) (Figura 1).



1494

1495 Figura 1. Gráfico da produção de citocinas IL-1 $\beta$ , por PBMCs de pacientes com IRR e controles em  
1496 cultura, após período de 24 horas. \*: p=0,0215, \*\*: p=0,0056, \*\*\*: p=0,0001; \*p<0,05 - Mann-Whitney Test,  
1497 Wilcoxon Test. Fonte: Autor,2021.

1498

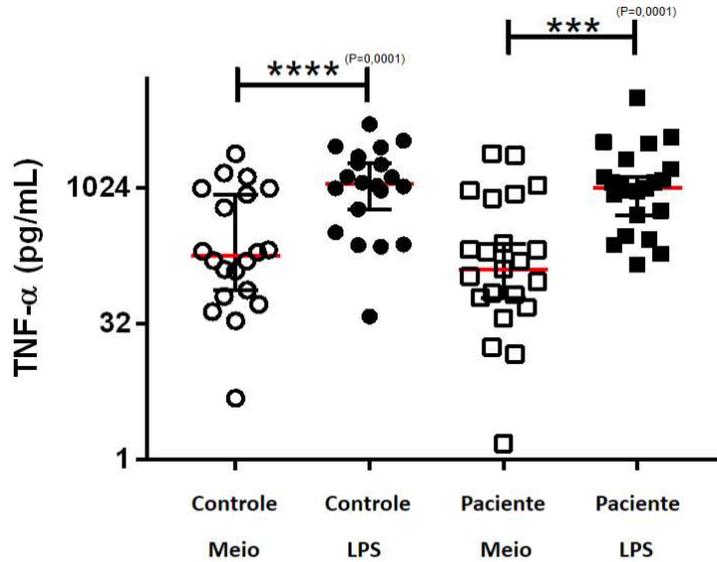
1499 **5.2.1.2. Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**

1500

1501 PBMCs de pacientes com IRR e controles quando não estimuladas  
1502 produziram TNF- $\alpha$  de forma semelhante (p=0,7359), assim como após estímulo com  
1503 LPS, os dois grupos também produziram TNF- $\alpha$  de forma semelhante (p=0,9051).  
1504 No entanto, após estímulo com LPS, tanto as PBMCs de pacientes com IRR quanto  
1505 as do grupo controle produziram mais TNF- $\alpha$  do que seus pares não estimulados

1506 (p=0,0001 e p=0,0001 respectivamente, \*p<0,05 -Mann-Whitney Test, Wilcoxon  
1507 Test) (Figura 2).

1508



1509

1510 Figura 2. Gráfico da produção de citocinas TNF-α, por PBMCs de pacientes com IRR e controles em  
1511 cultura, após período de 24 horas. \*\*\*: p=0,0001, \*\*\*\*: p=0,0001; \*p<0,05 - Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test.  
1512 Fonte: Autor,2021.

1513

### 1514 5.2.1.3. Interleucina-6 (IL-6)

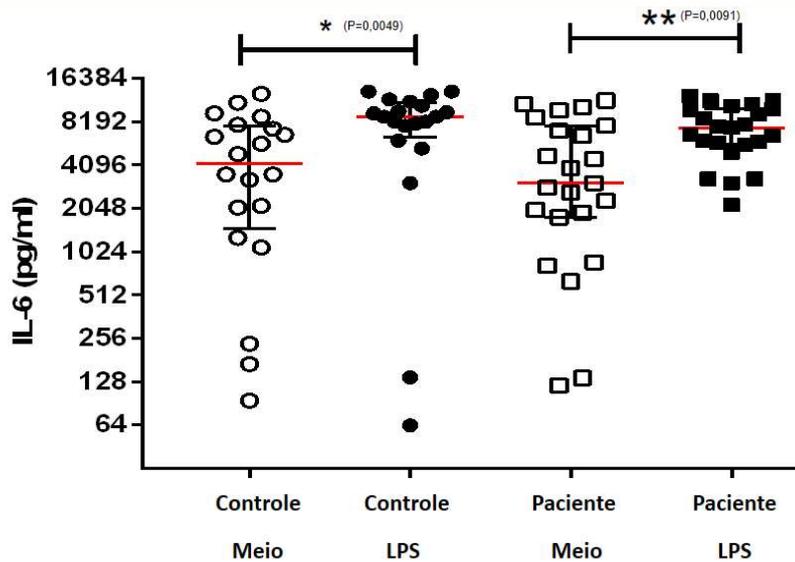
1515

1516 PBMCs de pacientes com IRR e controles quando não estimuladas  
1517 produziram IL-6 de forma semelhante (p=0,7221), da mesma forma que as PBMCs  
1518 de pacientes com IRR e controles após estímulo, produziram IL-6 de forma  
1519 semelhante (p=0,2527). Porém, após estímulo com LPS, tanto as PBMCs de  
1520 pacientes com IRR quanto as do grupo controle produziram mais IL-6 que seus  
1521 pares não estimulados (p=0,0091 e p=0,0049 respectivamente, \*p<0,05 -Mann-  
1522 Whitney Test, Wilcoxon Test) (Figura 3).

1523

1524

1525



1526

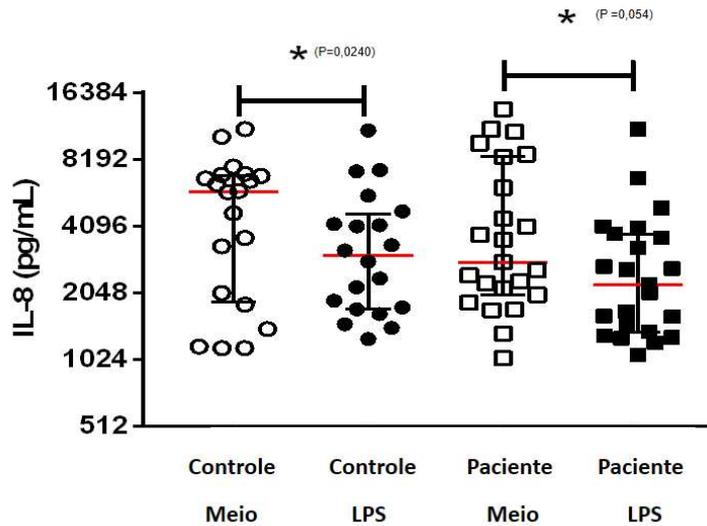
1527 Figura 3. Gráfico da produção de citocinas IL-6 por PBMCs de pacientes com IRR e controles, em  
 1528 cultura, após período de 24 horas. \*\*\*:  $p=0,0001$ , \*\*\*\*:  $p=0,0001$ ; \* $p<0,05$  - Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test.  
 1529 Fonte: Autor,2021.

1530

1531 **5.2.1.4. Interleucina-8 (IL-8)**

1532

1533 PBMCs de pacientes com IRR e controles quando não estimuladas  
 1534 produziram IL-8 de forma semelhante ( $p=0,6599$ ), da mesma forma que PBMCs de  
 1535 pacientes com IRR e controles após estímulo, produziram IL-8 de forma semelhante  
 1536 ( $p=0,1505$ ). Porém, após estímulo com LPS, tanto as PBMCs de pacientes com IRR  
 1537 quanto as do grupo controle produziram menos IL-8 que seus pares não estimulados  
 1538 ( $p=0,054$  e  $p=0,0240$  respectivamente, \* $p<0,05$  -Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test)  
 1539 (Figura 4).



1540

1541 Figura 4. Gráfico da produção de citocinas IL-8 por PBMCs de pacientes com IRR e controles em  
 1542 cultura, após período de 24 horas. \*\*\*: p=0,0001, \*\*\*\*: p=0,0001; \*p<0,05 - Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test.  
 1543 Fonte: Autor,2021.

1544

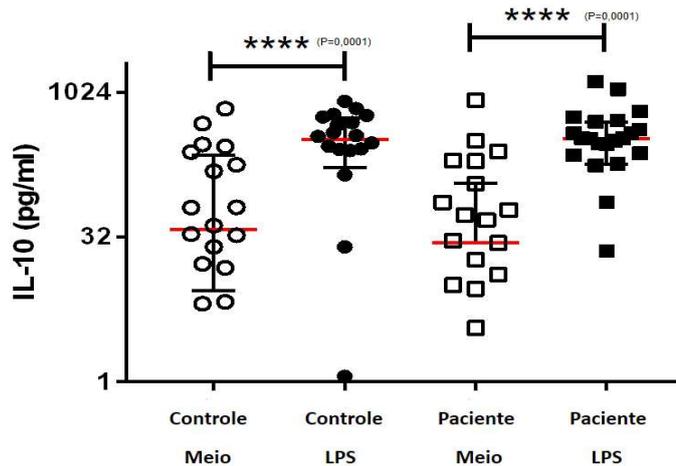
1545 **5.2.1.5. Interleucina-10 (IL-10)**

1546

1547 PBMCs de pacientes com IRR e controles quando não estimuladas  
 1548 produziram IL-10 de forma semelhante (p=0,5659), assim como as PBMCs de  
 1549 pacientes com IRR e controles após estímulo também produziram IL-10 de forma  
 1550 semelhante (p=0,7002). Porém após estímulo com LPS, tanto as PBMCs de  
 1551 pacientes com IRR quanto as do grupo controle produziram mais IL-10 do que seus  
 1552 pares não estimulados (\*\*\*\*p=0,0001 e \*\*\*\*p=0,0001respectivamente, \*p<0,05 -  
 1553 Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test) (Figura 5).

1554

1555



1556

1557 Figura 5. Gráfico da produção de citocinas IL-10 em PBMCs de pacientes com IRR e controles. \*\*\*\*:  
1558  $p=0,0001$ , \*\*\*\*:  $p=0,0001$ ; \* $p<0,05$  - Mann-Whitney Test, Wilcoxon Test. Fonte: Autor,2021.

1559

### 1560 5.3. Análise dos Anticorpos

1561

#### 1562 5.3.1. Detecção de Anticorpos IgG total Anti-toxina Tetânica (IgG total anti TT) e 1563 subclasses de IgG Anti-toxina Tetânica (IgG1, IgG2, IgG3 anti TT)

1564

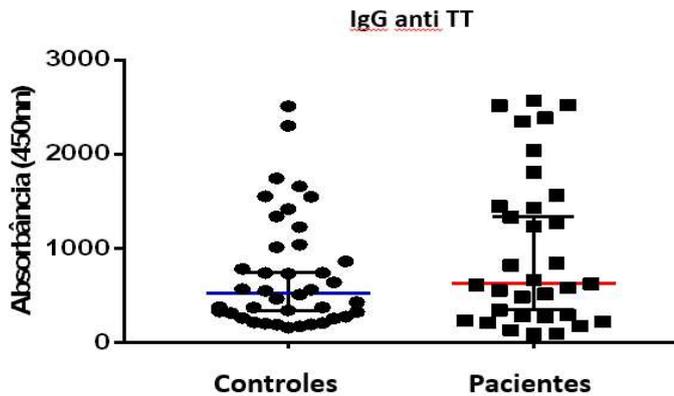
1565 A análise da Resposta Imune Humoral através da dosagem de Anticorpos IgG  
1566 total Anti-toxina Tetânica e subclasses de IgG Anti-toxina Tetânica (IgG1, IgG2,  
1567 IgG3) no plasma de pacientes com IRR e controles, pela técnica de ELISA indireto  
1568 apresentou os seguintes resultados:

1569

##### 1570 5.3.1.1. Anticorpos IgG total Anti-toxina Tetânica (IgG anti-TT)

1571 A concentração de IgG total anti-TT encontrada no plasma de crianças com  
1572 IRR comparadas à concentração de IgG total anti-TT encontrada no plasma de  
1573 crianças do grupo controle não apresentou diferença significativa ( $p= 0,1416$ ,  
1574 \* $p<0,05$  -Mann-Whitney Test) (Figura 6).

1575



1576

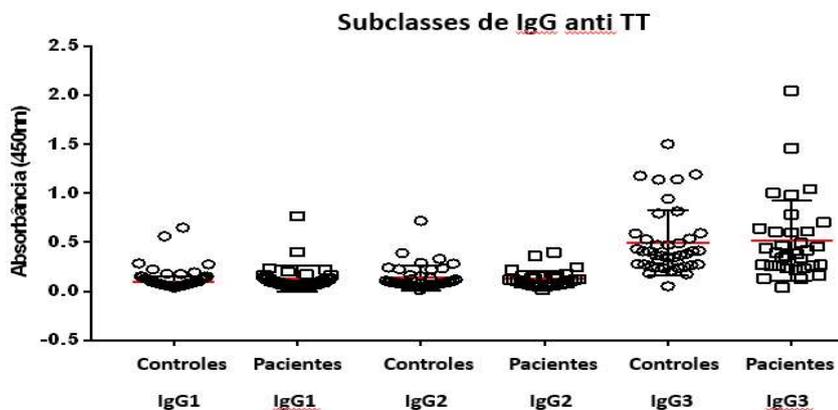
1577 Figura 6. Gráfico dos resultados da detecção de anticorpos IgG total (IgG anti- TT) no plasma de  
1578 crianças com IRR e controles pela técnica de ELISA indireto; \* $p < 0,05$  -Mann-Whitney Test. Fonte: Autor,2021

1579

### 1580 5.3.1.2. Subclasses de Anticorpos IgG Anti-Toxina Tetânica (IgG1, IgG2, IgG3 1581 anti-TT)

1582

1583 A concentração das subclasses de IgG anti-TT, IgG1, IgG2 e IgG3 encontrada  
1584 no plasma de crianças com IRR comparada a concentração delas encontrada no  
1585 plasma de crianças do grupo controle não apresentou diferença significativa  
1586 ( $p = 0,8436$ ,  $p = 0,6094$  e  $p = 0,9763$  respectivamente, \* $p < 0,05$  - Mann-Whitney Test)  
1587 (Figura 7).



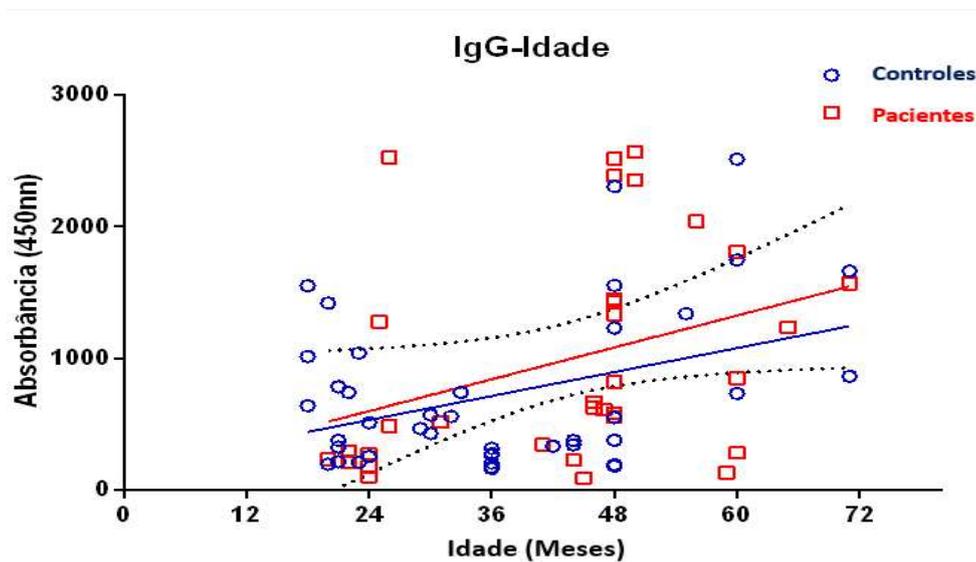
1588

1589 Figura 7. Gráfico da concentração das subclasses de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 no plasma de  
1590 crianças com IRR e controles pela técnica de ELISA indireto; \* $p < 0,05$  - Mann-Whitney Test. Fonte: Autor,2021.

1591 **5.3.1.3. Anticorpos IgG total Anti-Toxina Tetânica (IgG anti TT) e a idade das**  
1592 **crianças**

1593 A análise da concentração de IgG total anti-TT no plasma de crianças com  
1594 IRR e controles quando distribuído por idade mostra que, com a idade, à medida que  
1595 as crianças vão se desenvolvendo a concentração de anticorpos IgG total também  
1596 aumenta, tanto nos pacientes com IRR quanto nos controles, \*p<0,05 - Teste não  
1597 paramétrico de Spearman (Figura 8).

1598



1599  
1600

1601 Figura 8. Gráfico da concentração de anticorpos IgG total no plasma de crianças com IRR e controles  
1602 relacionado à idade; \*p<0,05 - Teste não paramétrico de Spearman. Fonte: Autor,2021.

1603  
1604  
1605  
1606  
1607  
1608  
1609  
1610

125  
126

61

1611

1612

1613

1614

1615

1616

1617

1618

1619

1620

1621

1622

1623

1624

1625

**DISCUSSÃO**

1626

1627

1628

1629 **6. DISCUSSÃO**

1630

1631 O objetivo do presente estudo foi investigar a resposta imune inflamatória  
1632 através da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e a resposta imune humoral  
1633 através da concentração de anticorpos antitoxina tetânica e subclasses de  
1634 anticorpos antitoxina tetânica (IgG1, IgG2 e IgG3) em crianças de 2 a 6 anos de  
1635 idade, com episódios de infecções respiratórias recorrentes. Foram selecionadas, 86  
1636 crianças das 113 iniciais, devido as demais (27 amostras) apresentarem dados  
1637 incompletos ou quantidade de amostra insuficiente à realização de todas as análises  
1638 propostas. Elas foram atendidas no ambulatório de pediatria geral da UFTM, e  
1639 apresentavam em média de 6 a 11 episódios de infecções respiratórias por ano,  
1640 sendo que todas eram hígidias, ou seja, não apresentavam uma doença de base que  
1641 justificassem a recorrência dos quadros.

1642 Analisamos os resultados obtidos através da produção de citocinas pró e anti-  
1643 inflamatórias por PBMCs de pacientes com IRR e controles, e com relação à  
1644 produção de IL-1 $\beta$ , que é uma citocina pró-inflamatória, observamos que quando não  
1645 estimuladas, PBMCs de pacientes com IRR produzem menos IL-1 $\beta$  que o grupo  
1646 controle. Esse resultado nos permite inferir que se PBMCs de crianças com IRR  
1647 apresentam níveis menores de IL-1 $\beta$  que as do grupo controle quando não  
1648 estimulados, crianças com IRR também podem apresentar menor concentração  
1649 basal de IL-1 $\beta$  que as crianças do grupo controle na ausência de um agente  
1650 infeccioso. Observamos também que, após estímulo com LPS, os níveis dessa  
1651 citocina foi semelhante nos dois grupos, e além disso, comparando os níveis de IL-  
1652 1 $\beta$  produzidos por PBMCs de crianças com IRR e grupo controle após estímulo com  
1653 LPS, observamos que os dois grupos produziram mais citocinas que seus pares não  
1654 estimulados. Com isso foi possível inferir que se PBMCs de crianças com IRR e  
1655 grupo controle produzem mais IL-1 $\beta$  após estímulo, e em concentrações  
1656 semelhantes as produzidas por seus pares não estimulados, crianças com IRR e as  
1657 do grupo controle também podem produzir mais IL-1 $\beta$  e em concentrações  
1658 semelhantes após contato com um agente infeccioso. Ou seja, os dois grupos  
1659 apresentam condições semelhantes de desenvolver processo inflamatório.

1660 Estudos mostram que a citocina IL-1 $\beta$  é um dos principais fatores a predispor  
1661 IR com maior gravidade, além de possuir características pró-inflamatórias, que  
1662 favorecem a migração de células do sangue para os sítios inflamatórios (Mc  
1663 NAMARA *et al.*, 2002). Ela pode ser produzida por uma variedade de células em  
1664 resposta a invasão de microrganismos, e com isso estimular a cascata de  
1665 inflamação, atraindo neutrófilos e promovendo a produção de moduladores, como IL-  
1666 6 e IP-10 (BURKE *et al.*, 2013). Mostram também que macrófagos residentes  
1667 sozinhos não são capazes de conter e destruir bactérias durante a infecção, e com  
1668 isso acabam atraindo leucócitos polimorfonucleares (PMNs) para auxiliar na  
1669 contenção. Como as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, são secretadas por  
1670 macrófagos e atuam como agentes quimiotáticos para PMNs, acabam aumentando  
1671 a atividade fagocítica que ocorre nos pulmões. Por outro lado, a superprodução  
1672 dessas citocinas pode ter um efeito destrutivo, danificando a estrutura normal do  
1673 pulmão, aumentando a morbidade e mortalidade (MONTÓN *et al.*, 1998).

1674 Casos importantes de Infecções de Vias Aéreas em crianças foi relatado em  
1675 estudo que associou maior produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 à baixa produção sistêmica de  
1676 IFN- $\gamma$ , mostrando que uma resposta inflamatória intensa e desregulada de vias  
1677 aéreas podem contribuir para doenças pulmonares mais graves (PIZZUTTO *et al.*,  
1678 2015). Outro estudo em crianças com infecção pelo vírus H1N1, que avaliou a  
1679 expressão da IL-1 $\beta$  e IL-6 no plasma dessas crianças, mostrou que a infecção induz  
1680 uma regulação positiva nessas citocinas, e que elas desempenham um papel pro-  
1681 inflamatório que pode contribuir com a inflamação das vias aéreas e também para a  
1682 hiper-reatividade brônquica nesses pacientes (CHIARETTI *et al.*, 2013).

1683 Estudo em crianças com fibrose cística, que analisou a sinalização de IL-1,  
1684 inflamação neutrofílica e alterações estruturais no pulmão apresentadas por elas,  
1685 mostrou que a IL-1 $\alpha$  e IL- $\beta$  foram detectáveis no lavado broquioalveolar dessas  
1686 crianças na ausência de infecção, porém elas estavam aumentadas na presença de  
1687 infecção bacteriana. Esse aumento ainda foi associado ao aumento de IL-8 e  
1688 também de neutrófilos (MONTGOMERY *et al.*, 2018).

1689

1690

1691 Com relação a produção de citocinas TNF- $\alpha$  por PBMCs de pacientes com IRR  
1692 e controles, que também é uma citocina pró-inflamatória, observamos que as  
1693 PBMCs de pacientes com IRR e controles quando não estimuladas produzem uma  
1694 concentração de TNF- $\alpha$  semelhante, e da mesma forma, após estímulo com LPS, os  
1695 dois grupos produzem uma concentração de TNF- $\alpha$  de forma semelhante. Porém,  
1696 observamos que a produção de TNF- $\alpha$  por PBMCs de pacientes com IRR e  
1697 controles após estímulo com LPS, apresentou aumento significativo em relação a  
1698 seus pares não estimulados, e isso nos permite inferir que, se PBMCs de crianças  
1699 com IRR e controles produziram mais TNF- $\alpha$  após estímulo e de forma semelhante,  
1700 após contato com um agente infeccioso elas também podem produzir mais TNF- $\alpha$  e  
1701 também de forma semelhante.

1702 O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por  
1703 monócitos, macrófagos e linfócitos T, e são abundantes em diversos tecidos do  
1704 corpo (LIN *et al.*, 2000).

1705 Estudos com pacientes infectados pelo VSR mostraram que, eles podem  
1706 produzir TNF- $\alpha$  juntamente com a IL-1 $\beta$ , através das células epiteliais respiratórias  
1707 infectadas pelo vírus, ativando a cascata de mediadores pró-inflamatórios,  
1708 promovendo recrutamento, migração e adesão de tipos específicos de leucócitos  
1709 (monócitos, neutrófilos e linfócitos T) aos tecidos afetados pela ação viral, e isso  
1710 pode contribuir no controle da infecção, mas também promover o dano tecidual (Mc  
1711 NAMARA *et al.*, 2002). E VIEIRA e colaboradores (2010), também identificaram a  
1712 importância do estudo em crianças com infecções pulmonares por VSR, mostrando  
1713 que o aumento dos mediadores inflamatórios tem um efeito significativo tanto na  
1714 resposta inflamatória inicial como nos eventos imunológicos tardios, e soma-se a  
1715 esses fatores a frequência, a morbidade e a mortalidade elevadas durante a infância.

1716 Analisamos os níveis de IL-6, que também é uma citocina pró-inflamatória,  
1717 produzida por PBMCs de pacientes com IRR e controles, e observamos que a  
1718 produção de IL-6 por PBMCs de pacientes com IRR e controles quando não  
1719 estimulados, não apresentaram diferença significativa, da mesma forma que após  
1720 estímulo com LPS. Porém, após estímulo observamos uma maior produção dessa  
1721 citocina nos dois grupos, quando comparados a seus pares não estimulados. Esses

1722 resultados sugerem que se após estímulo essas células produzem mais IL-6 que  
1723 seus pares não estimulados e de forma semelhante, após contato com agente  
1724 infeccioso, crianças com IRR e controles também podem produzir mais IL-6 e  
1725 também em concentrações semelhantes.

1726 De acordo com a literatura, assim como a IL-1 $\beta$  e a TNF- $\alpha$ , a IL-6 também é  
1727 uma citocina pró-inflamatória, e pode ser produzida por vários tipos celulares, sendo  
1728 as células B, T e monócitos as principais fontes. Os estímulos para a sua síntese  
1729 são IL-1, LPS e TNF (ROTHERWELL, 1991).

1730 Estudo que investigou mediadores inflamatórios na secreção nasofaríngea e  
1731 no soro de crianças com infecção do trato respiratório inferior por VSR e a gravidade  
1732 da doença, observou uma correlação positiva significativa entre a gravidade da  
1733 doença na admissão hospitalar e as concentrações de sICAM-1 e de IL-10 na  
1734 secreção nasofaríngea e de IL-6 no soro dos pacientes. Os autores sugerem que as  
1735 concentrações de sICAM-1 e IL-10 na secreção nasofaríngea e de IL-6 no soro  
1736 determinadas na admissão poderiam ser usadas como marcadores de gravidade da  
1737 ITRI por VSR, e também que os níveis de IL-6 determinados no soro na admissão  
1738 também poderiam ser usados para prever a necessidade da oxigenoterapia e a  
1739 duração da internação (VIEIRA *et al.*, 2010).

1740 HAUJEN e colaboradores (2015), avaliou a concentração de citocinas no  
1741 plasma de crianças com pneumonia grave e não grave adquirida na comunidade e  
1742 observou que nos casos graves, elas estavam aumentadas, associando G-CSF e IL-  
1743 6 aos casos mais graves. E CHIARETTI e colaboradores (2013), também avaliou IL-  
1744 1 $\beta$  e IL-6 em crianças com infecção pelo H1N1, e também relacionou os casos mais  
1745 graves com comprometimento respiratório e febre ao aumento significativo da IL-6.

1746 JONES e colaboradores (2005), mostraram que a IL-6 pode modular diversos  
1747 aspectos do sistema imunológico inato, incluindo hematopoiese e o acúmulo de  
1748 neutrófilos em locais de infecção ou trauma através do controle da granulopoiese.  
1749 Segundo eles, essa modulação poderia ser atribuída à regulação de quimiocinas  
1750 ativadoras de neutrófilos e apoptose de neutrófilos por IL-6.

1751 Analisamos os níveis da quimiocina IL-8 produzidas por PBMCs de pacientes  
1752 com IRR e controles, que é uma quimiocina pró-inflamatória, e observamos que a

1753 produção de IL-8 por essas células quando não estimuladas não apresentaram  
1754 diferença significativa, da mesma forma que após estímulo com LPS. Porém, após  
1755 estímulo observamos uma menor produção dessa citocina nos dois grupos quando  
1756 comparado a seus pares não estimulados. Esses resultados indicam que se após  
1757 estímulo essas células produzem menos IL-8 que seus pares não estimulados, e de  
1758 forma semelhante, após contato com agente infeccioso, crianças com IRR e  
1759 controles também podem produzir menos IL-8 e em concentrações semelhantes. De  
1760 acordo com nossos resultados, a IL-8 foi a única que diminuiu após estímulo.

1761 Sabe-se que a IL-8 é uma quimiocina cuja ação principal é o grande estímulo  
1762 migratório de células do sistema imune, principalmente neutrófilos. Que ao ativar  
1763 polimorfonucleares, acaba aumentando também o metabolismo oxidativo, podendo  
1764 determinar ainda um aumento da expressão de moléculas de adesão por células  
1765 endoteliais. Ela é produzida principalmente por monócitos/macrófagos e em menor  
1766 quantidade por fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, melanócitos,  
1767 hepatócitos e condrócitos e seus estímulos normalmente são a IL-1, TNF-  $\alpha$  e IFN- $\gamma$   
1768 (BAGGIOLINI *et al.*, 1994; ZWAHLEN *et al.*, 1993).

1769 Estudo em crianças com infecção pelo hRSV, correlacionou os níveis  
1770 elevados de IL-6, IL-8 (CXCL8), CCL2 e CCL4 no LCR de pacientes com  
1771 bronquiolite grave e encefalopatia ao vírus, e mostrou que esse aumento contribui  
1772 potencialmente de forma prejudicial para o dano tecidual do trato respiratório e do  
1773 SNC (BOHMWALD K, *et al.*, 2019).

1774 Por outro lado, Don e colaboradores (2007), analisaram crianças com IRR e  
1775 deficiência na fagocitose e na produção de ROS por neutrófilos PMN, mostrou que  
1776 essas variações poderiam estar associadas a gênese das IRR na infância. E esses  
1777 dados foram confirmados por CALAPODOPULOS e colaboradores (2018), ao avaliar  
1778 ROS em crianças de 2 a 6 anos de idade com IRR, que associaram a menor  
1779 produção dessas espécies reativas de oxigênio (ROS) a presença de IRR  
1780 apresentadas por elas.

1781 A IL-8 também foi relacionada a maior dano tecidual e a pior prognóstico  
1782 apresentado por pacientes com doenças pulmonares graves, e de acordo com esse  
1783 estudo, enquanto o LPS, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  aumentam a produção de IL-8, IL-10 é um

1784 inibidor potente da síntese de IL-8 e parece desempenhar um papel autorregulador.  
1785 Relata ainda que, a participação de neutrófilos podem intensificar esses danos, e  
1786 sugerem que o uso de um antagonista ou bloqueador desse mecanismo poderia  
1787 servir como adjuvante no bloqueio do tráfego in vivo de neutrófilos sugerindo que o  
1788 antagonismo de IL-8 no nível do receptor ou o bloqueio da IL-8 por exemplo, poderia  
1789 ser usado como uma estratégia terapêutica (PEASE *et al.*, 2002).

1790         Analisamos os níveis da citocina IL-10, produzida por PBMCs de pacientes  
1791 com IRR e controles, que é uma citocina anti-inflamatória, e observamos que entre  
1792 os grupos não houve diferença significativa na produção dessa citocina quando não  
1793 estimuladas, da mesma forma que após estímulo com LPS. Porém, após estímulo  
1794 observamos uma maior produção dessa citocina nos dois grupos quando comparado  
1795 a seus pares não estimulados. Esses resultados indicam que se após estímulo essas  
1796 células produzem mais IL-10 que seus pares não estimulados, e em concentrações  
1797 semelhantes, após contato com agente infeccioso, crianças com IRR e controles  
1798 também podem produzir mais IL-10 e em concentrações semelhantes.

1799         A IL-10 é uma das principais citocinas com capacidade de regular e suprimir a  
1800 expressão de citocinas pró-inflamatórias durante as fases de recuperação de  
1801 infecções e de redução dos danos causados por citocinas inflamatórias. Ela  
1802 apresenta efeitos imunorreguladores capaz de evitar danos ao tecido do hospedeiro,  
1803 controlando a dimensão dessas respostas imunológicas (OUYANG *et al.*, 2011;  
1804 BROOKS *et al.*, 2006). É considerada como uma das principais citocinas anti-  
1805 inflamatórias servindo como um regulador negativo da resposta imune inata e de  
1806 células imunes adaptativas, durante infecções persistentes por bactérias e parasitas,  
1807 suprimindo a depuração do patógeno associados a infecção, e também foi citada  
1808 como mediadora em casos de persistência do vírus durante infecções virais crônicas  
1809 (MOORE *et al.*, 2001; COUPER *et al.*, 2008; EJRNAES *et al.*, 2006; BROOKS *et al.*,  
1810 2006; HUMPHREYS *et al.*, 2007).

1811         Vários tipos de células foram descritos como produtores de IL-10  
1812 constitutivamente ou em resposta a estímulos inflamatórios, como as células Treg,  
1813 células dendríticas e também as células TCD4+ efectoras, durante infecções por  
1814 protozoários (MOORE *et al.*, 2001; MAYNARD *et al.*, 2007; O'GARRA A & VIEIRA  
1815 2007; JANKOVIC *et al.*, 2007; ANDERSON *et al.*, 2007).

1816           Analisamos a resposta imune adaptativa humoral, através da dosagem de  
1817 anticorpos IgG Anti-Toxina Tetânica (IgG anti TT) no plasma de pacientes com IRR e  
1818 controles e observamos que a concentração de IgG anti-TT nessas crianças não  
1819 apresentou diferença significativa. Com esses resultados, foi possível inferir que os  
1820 dois grupos apresentaram uma resposta importante a anticorpos específicos.

1821           Sabemos que a vacinação se constitui no meio mais eficaz, seguro e  
1822 econômico de prevenção do tétano. Que a vacina antitetânica tem como antígeno o  
1823 toxóide tetânico, obtido a partir da toxina tetânica inativada pelo formaldeído e além  
1824 disso, o toxóide tetânico induz a produção de anticorpos neutralizantes da classe  
1825 IgG (antitoxina), que é altamente imunogênico, seguro e promove quase 100% de  
1826 proteção após um esquema de imunização, sendo que o nível mínimo de anticorpos  
1827 séricos considerado protetor é de 0,01 UI/ml (MENDOZA *et al.*, 2009).

1828           ROPER e colaboradores (2007), também corroboram da proteção após  
1829 imunização e demonstraram que após aplicação de doses sucessivas de DTP, o  
1830 período de proteção aumenta gradualmente e que a partir da 4ª dose, os níveis  
1831 protetores de anticorpos permanecem pelo menos por 10 anos, para a maioria das  
1832 pessoas vacinadas.

1833           Por fim, analisamos as concentrações de Subclasses de IgG Anti-toxina  
1834 Tetânica (IgG1, IgG2, IgG3 anti TT) no plasma de pacientes com IRR e controles e  
1835 observamos que a concentração dessas subclasses de anticorpos também não  
1836 apresentou diferença significativa entre os grupos. Esses achados nos permitem  
1837 inferir que crianças com IRR assim como as do grupo controle apresentam a mesma  
1838 capacidade de desenvolver resposta imune humoral a antígeno, de forma específica.

1839           A deficiência de subclasses de IgG é uma das quatro doenças mais comuns  
1840 em crianças com imunodeficiência primária (IDP), e pacientes com deficiência de  
1841 subclasses de IgG podem sofrer de infecção recorrente, podem ser pacientes  
1842 subclínicos, mas alguns podem apresentar infecções graves que pode levar a morte  
1843 (STIEHM, 2008; OCHS *et al.*, 2004).

1844           Esses quadros de IRR na infância pode ser mais frequente, ainda que  
1845 transitórios, como por exemplo, os caracterizados por inabilidade seletiva de  
1846 resposta a antígenos polissacarídeos (FOLLIN *et al.*, 1997; GIGLIOTTI *et al.*, 1988).

1847 Sabe-se que a ausência de resposta de anticorpos a antígenos polissacarídeos  
1848 bacterianos, na presença de resposta normal a antígenos proteicos, é uma  
1849 característica comum nesses pacientes (AMBROSINO *et al.*, 1987).

1850         Estudo com seguimentos mais prolongados de OMAR (Otite Media Aguda  
1851 Recorrente), correlacionam causa de infecções recorrentes a imaturidade do sistema  
1852 imunológico, mostrando que crianças que apresentavam deficiência de IgG2, com a  
1853 idade adulta, passaram a apresentar taxas normais dessa imunoglobulina. Eles  
1854 mostram também que não seria o valor sérico absoluto da IgG2 abaixo da  
1855 normalidade a responsável pelas otites de repetição, e sim, a deficiência seletiva de  
1856 anticorpos específicos contra antígenos polissacarídeos da cápsula do  
1857 *Streptococcus pneumoniae* a grande responsável pela recorrência da doença  
1858 (SHACKELFORD *et al.*, 1990; BERMAN *et al.*, 1992).

1859         A avaliação dos níveis séricos de subclasses de Imunoglobulinas em crianças  
1860 com problemas crônicos do trato respiratório, encontrou deficiência leve de IgG1,  
1861 através da determinação das concentrações de subclasse de IgG sérica. Nesse  
1862 estudo, 24 pacientes analisados apresentaram concentração sérica de IgG1 < 4,9 g/l  
1863 (ou seja, abaixo do valor de referência) e valores normais de IgG2, IgM e IgA. Esses  
1864 resultados foram associados a pacientes com infecções sinopulmonares recorrentes,  
1865 mostrando que uma leve deficiência de subclasse IgG1 poderia apresentar uma  
1866 resposta IgG1 anti-polissacarídeo deficiente (VAN KESSEL *et al.*, 1999).

1867         A IgG3 compreende apenas uma pequena fração de IgG, e permaneceu  
1868 relativamente pouco estudada até anos recentes. Ela apresenta características  
1869 adicionais não presentes em outras subclasses de IgG, que a torna uma  
1870 imunoglobulina com grande potencial de desencadear funções efetoras, incluindo  
1871 ativação do complemento, fagocitose mediada por anticorpo (Ac) ou citotoxicidade  
1872 celular mediada por Ac (ADCC). Estudos recentes relatam a importância de suas  
1873 funções efetoras contra uma gama de patógenos e abordam maneiras de superar  
1874 limitações associadas a IgG3, como meia-vida curta de Ac e ativação pró-  
1875 inflamatória excessiva. Sugerem ainda que uma melhor compreensão das  
1876 propriedades molecular e funcional da IgG3 podem facilitar o desenvolvimento de  
1877 melhores imunoterapias e vacinas baseadas em Ac contra doenças infecciosas  
1878 (DAMELANG *et al.*, 2019).

1879 IgG2 sérica de indivíduos adultos com infecções respiratórias agudas  
1880 recorrentes e adultos normais saudáveis foram comparadas, e observou-se que a  
1881 média de IgG2 sérica foi significativamente menor em pacientes com infecção  
1882 respiratória crônica e IRR. Enquanto que a média de IgG3 sérica foi  
1883 significativamente maior naqueles com infecção respiratória crônica e IRR. Nesse  
1884 estudo os autores relatam a importância da triagem de pacientes com infecção  
1885 respiratória crônica ou recorrente nas deficiências de subclasse de IgG, com vista ao  
1886 benefício obtido em terapia com uso de gamaglobulina (STANLEY *et al.*, 1984).

1887 Dados da literatura mostram que as quatro subclasses de IgG têm  
1888 propriedades biológicas diferentes e certos anticorpos tendem a ser específico de  
1889 cada subclasse (SPEIGELBERG *et al.*, 1974; YOUNT *et al.*, 1967; ANDERSEN *et*  
1890 *al.*, 1968). Além disso, mostram também que uma IgG normal, consiste em  
1891 aproximadamente 66% de IgG1, 23% de IgG2, 7% de IgG3 e 4% de IgG4 (YOUNT  
1892 *et al.*, 1967).

1893 Deficiências seletivas de uma ou mais das subclasses de IgG podem  
1894 aumentar a suscetibilidade a infecções piogênicas recorrentes (SCHUR *et al.*, 1970).  
1895 E mesmo com IgG total normal, deficiência de IgG2 isolado ou em combinação com  
1896 IgG4 foi associado a infecções recorrentes, e quando combinado à deficiência de  
1897 IgA também foi associada a pacientes com IRR (OXELIUS, 1974; OXELIUS *et al.*,  
1898 1981).

1899 É evidente a necessidade de mais estudos que associem as IRR à  
1900 capacidade do Sistema Imune em responder aos agentes infecciosos, causadores  
1901 de infecções. A ação efetiva da resposta imune inata com base na resposta  
1902 inflamatória, e da resposta imune adaptativa com base na resposta humoral é  
1903 fundamental para o hospedeiro. E quando se trata da fase inicial da vida, quando as  
1904 crianças apresentam seu sistema imunológico pouco desenvolvido ou ainda em  
1905 desenvolvimento, a ação efetiva dessas respostas é ainda mais importante.

1906 Tão importante quanto a proteção através de uma resposta efetiva, é uma  
1907 resposta adequada que não traga consequências pela sua intensidade, ou seja, a  
1908 intensidade dessas respostas deve ser balanceada para que não acarrete danos a  
1909 essas crianças durante a resposta imune inicial. Nesse sentido, estudamos a  
1910 resposta imune inata através da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-

1911 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL -6, IL-8 e IL-10) e a resposta imune adaptativa humoral através da  
1912 produção de anticorpos IgG antitoxina tetânica (IgG anti TT) e subclasses de IgG  
1913 antitoxina tetânica (IgG1, IgG2, IgG3 anti TT) em crianças de 2 a 6 anos de idade,  
1914 com e episódios de IRR.

1915 Os resultados aqui apresentados indicam que crianças com IRR e grupo  
1916 controle apresentam capacidade de resposta de citocinas induzidas por LPS  
1917 semelhantes, assim como de produção de anticorpos para antígeno T dependente.  
1918 Dentro dos vários mediadores da resposta imune analisados, chamou atenção a  
1919 menor produção de IL-1 $\beta$ , em culturas não estimuladas, pelo grupo de crianças com  
1920 IRR.

1921

1922

1923

1924

1925

1926

1927

1928

1929

1930

1931

1932

1933

1934

1935

1936

147  
148

72

1937

1938

1939

1940

1941

1942

1943

1944

1945

1946

1947

1948

1949

1950

1951

1952

1953

**Conclusão**

1954 **7. CONCLUSÃO**

1955

1956 De acordo com os resultados, crianças com IRR e grupo controle apresentam  
1957 capacidade de resposta de citocinas induzidas por LPS semelhantes, assim como de  
1958 produção de anticorpos para antígeno T dependente. Dentre os vários mediadores  
1959 da resposta imune analisados, chamou atenção a menor produção de IL-1 $\beta$ , em  
1960 culturas não estimuladas, pelo grupo de crianças com IRR. Este achado sugere que  
1961 este grupo pode apresentar uma ativação basal menor, e que essa menor ativação  
1962 pode estar influenciando em sua capacidade e velocidade de resposta inflamatória.  
1963 Outro fator observado foi a menor produção de IL-8, que pode ter sido modulada  
1964 pela IL-10, fazendo com que esse grupo responda com menos danos aos tecidos e  
1965 com melhor prognóstico.

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974

1975

1976

1977

1978

1979

1980 **8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

1981

1982 A ausência de conhecimento da natureza dos microorganismos causadores  
1983 das infecções, bem como a presença de variações morfológicas das vias aéreas  
1984 superiores nas crianças com IRR.

1985

1986 **9. VANTAGENS DO ESTUDO**

1987

1988 As avaliações laboratoriais foram realizadas em um único momento, além  
1989 disso, foi possível abordar elementos de Resposta Imune Inata e Adaptativa.

1990

1991

1992

1993

1994

1995

1996

1997

1998

1999

2000

2001

2002

2003

153  
154

75

2004

2005

2006

2007

2008

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2021

2022

2023

## **REFERÊNCIAS**

2024 **REFERÊNCIAS**

2025

2026 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JSP. Cellular and Molecular Immunology.  
2027 Philadelphia: WB Saunders Company. p.417, 1994.

2028 Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age.  
2029 **Immunology**, v. 4, p. 553-64, 2004.

2030 Ambrosino D, Siber G, Chilmonczyk B, Jernberg J and Finberg R. An  
2031 immunodeficiency characterized by impaired antibody response to polysaccharides.  
2032 N. Engl. **J. Med**, v. 316, p. 790–79, 1987.

2033 Andersen BR, Terry WD. Gamma G4 globulin antibody causing inhibition of clotting  
2034 factor VIII. **Nature**, v. 217, p.174, 1968.

2035 Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ & Sacks D. CD4+ CD25 Foxp3 TH1 cells are  
2036 the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous  
2037 leishmaniasis. **J. Exp. Med**, v.204, p. 285–297, 2007.

2038 Antuñano, F. J. L., 1997. Epidemiología de las infecciones respiratorias agudas en la  
2039 infancia: Panorama regional. In: Infecciones Respiratorias em Niños (Y. Benguigui,  
2040 F. J. L. Antuñano, G. Schmu-nis & J. Yunes, org.), pp. 3-23, Washington,  
2041 DC:Organización Panamericana de la Salud.

2042 Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin 8 and related chemotactic cytokines –  
2043 CXC and CC chemokines. **Adv Immunol**, v. 55, p.97-179, 1994.

2044 Beber LCC, Gewehr DM, Cecconello L, Sulzbacher MM, Heck TG, Berlezi EM.  
2045 Fatores de risco para doenças respiratórias em crianças brasileiras: revisão  
2046 integrativa. **RIES**, v. 10, n.1, p.19, 2020.

2047 Benicio MHD'A, Cardoso MRA, Gouveia NC e Monteiro CA. Tendência secular da  
2048 doença respiratória na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Rev Saúde**  
2049 **Pública**, v. 34, n.6, p. 91-101, 2000.

- 2050 Berman S, Lee B, Nuss R, Roark R, Giclas PC. Immunoglobulin G, total and  
2051 subclass, in children with or without recurrent otitis media. **J Pediatr**, v. 121, n. 2, p.  
2052 249- 51, 1992.
- 2053 Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v.125, p.33-40,  
2054 2010.
- 2055 Boyle RJ, Le C, Balloch A, Tang M L-K. The clinical syndrome of specific antibody  
2056 deficiency in children. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 3, p. 486-492, 2006.
- 2057 Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, Mc Gavern DB and Oldstone MBA.  
2058 Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. **Nature Medicine**, v.  
2059 12, n. 11, p. 1301– 1309, 2006.
- 2060 Burke SJ, Goff MR, Lu D, Proud D, Karlstad MD, Collier JJ. Synergistic expression of  
2061 the CXCL10 gene in response to IL-1beta and IFN-gamma involves NF-kappa B,  
2062 phosphorylation of STAT1 at Tyr701, and acetylation of histones H3 and H4. **J**  
2063 **Immunol**, v. 191, p. 323–336, 2013.
- 2064 Calapodopulus N. Dissertação de Mestrado: Associação entre infecções  
2065 respiratórias recorrentes e baixa produção de intermediários do oxigênio em crianças  
2066 de 1 a 6 anos de idade, 2018. Banco de Tese da Biblioteca da UFTM.
- 2067 Carvalho BTC, Nudelman V, Carneiro-Sampaio MMS. Mecanismos de defesa contra  
2068 infecções. **Revista de Pediatria**, V. 74, Supl.1, p. S3-S11, 1998.
- 2069 Chatkin, J. M.; Zaslavski, D. & Scliair, M. J. Doenças respiratórias agudas no Rio  
2070 Gran-de do Sul, Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 102, p.  
2071 340-344, 1987.
- 2072 Clapp WD. Developmental Regulation of the Immune System. **Seminars in**  
2073 **Perinatology**.; V. 30, n. 2, p. 69-72, 2006.
- 2074 Condino-Neto A. Susceptibility to infections: immunological immaturity or  
2075 immunodeficiency? **Rev Med**, v. 93, n. 2, p. 78-82, 2014.
- 2076 Connors TJ, Ravindranath TM, Bickham KL, Gordon CL, Zhang F, Levin B, Baird JS,  
2077 and Farber DL. Airway CD81 T Cells Are Associated with Lung Injury during Infant

- 2078 Viral Respiratory Tract Infection. **Am J Respir Cell Mol Biol**, V. 54, n. 6, p. 822–830,  
2079 2016.
- 2080 Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The master regulator of immunity to  
2081 infection. **J. Immunol**, v. 180, p. 5771–5777, 2008.
- 2082 Damelang T, Rogerson SJ, Kent SJ, Chung AW. Role of IgG3 in Infectious Diseases.  
2083 **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 197-211, 2019.
- 2084 DATASUS, Proporção de óbitos por infecção respiratória aguda em menores de  
2085 5anos de idade, 2011. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c07.def>. Acesso em 12 maio 2021.  
2086
- 2087 De Baets F, Kint J, Pawels R, Laray J. IgG subclass deficiency in children with  
2088 reccurent bronchitis. **Eur. J. Pediatr**, v. 151, p. 274–278, 1992.
- 2089 de Martino M, Ballotti S. The child with recurrent respiratory infections: normal or not?  
2090 **Pediatr Allergy Immunol**, v. 18, Sup. 18, p. 13-18, 2007.
- 2091 Don M, Fasoli L, Gregorutti V, Pisa F, Valent F, Prodan M, Canciani M. Recurrent  
2092 Respiratory Infections and Phagocytosis in Childhood. **Pediatrics International**, v.  
2093 49, p. 40–47, 2007.
- 2094 Ejrnaes M *et al.* Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor  
2095 blockade. **J. Exp. Med**, v. 203, p. 2461–2472, 2006.
- 2096 Follin P, Ulanova M, Hahn-Zoricand M, Hanson LA. Invasive *Haemophilus influenza*  
2097 type b (Hib) infection in an adult patient with a selective deficiency of antibody to the  
2098 Hib capsular polysaccharide. **Clin. Infect. Dis**, v. 25, p. 915–917, 1997.
- 2099 Fulginiti VA, Sieber OF. Immune mechanisms in infectious diseases. In: Stiehm ER.  
2100 **Immunologic disorders in infants and children**, p. 687-701, 1980.
- 2101 Gern JE, Martin MS, Anklam KA, Shen K, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, Adler K,  
2102 Gilbertson-White S, Hamilton R, Shult PA, Kirk CJ, Da Silva DF, Sund SA,  
2103 Kosorokand MR, Lemanske Jr. RF. Relationships among specific viral pathogens,  
2104 virus-induced interleukin-8, and respiratory symptoms in infancy. **Pediatr Allergy**  
2105 **Immunol**, v. 13, p. 386–393, 2002.

- 2106 Gigliotti F, Herrod H, Kalwinsky D and Insel R. Immunodeficiency associated with  
2107 recurrent infections and an isolated in vivo inability to respond to bacterial  
2108 polysaccharides. **Pediatr. Infect. Dis. J**, v. 7, p. 417–420, 1988.
- 2109 Graham NMH. The epidemiology of acuterespiratory infections in children and adults:  
2110 A global perspective. **Epidemiology Review**, v. 12, p. 149-178, 1991.
- 2111 Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response.  
2112 **Biochem J**, v. 265, n. 3, p. 621-636, 1990.
- 2113 Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and  
2114 early life. **Allergy**, v. 55, p. 588-697, 2000.
- 2115 Humphreys IR *et al.* Cytomegalovirus exploits IL-10–mediated immune regulation in  
2116 the salivary glands. **J. Exp. Med**, v. 204, p. 1217–1225, 2007.
- 2117 Jacob CMA, Pastorino AC. Desenvolvimento do sistema imunológico. **Alergia e**  
2118 **imunologia para o pediatra**. Editora Manole. P. 3-17, 2010.
- 2119 Janeway CA, Travers P. Immunobiology: the immune system in health and disease.  
2120 London: **Current Biology/Garland**. V. 1, p. 28, 1994.
- 2121 Jankovic D *et al.* Conventional T-bet+ Foxp3 TH1 cells are the major source of host-  
2122 protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **J. Exp. Med**, v.  
2123 204, p. 273–283, 2007.
- 2124 Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-  
2125 6. **J. Immunol**, v. 175, p. 3463–3468, 2005.
- 2126 Knight SC, Stagg AJ. Antigen-presenting cell types. **Curr Opin Immunol**, v. 5, p.  
2127 374-82, 1993.
- 2128 Lambert L and Culley FJ. Innate Immunity to Respiratory Infection in Early Life.  
2129 **Front. Immunol**, v. 8, p. 1570, 2017.
- 2130 Le Messurier KS, Tiwary M, Morin NP, Samarasinghe AE. Respiratory Barrier as a  
2131 Safe guardand Regulator of Defense Against Influenza A Virus and Streptococcus  
2132 Pneumoniae. **Frontiers in Immunology**, V. 11, p. 3, 2020.

- 2133 Lin E, Calvano SE, Lowry SF – Inflammatory cytokines and cell response in surgery.  
2134 **Surgery**, v. 127, p.117-126, 2000.
- 2135 Lopes AJ, Noronha AJ, Mafort TT. Mecanismos de Defesa do Aparelho Respiratório.  
2136 **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, n. 2, 2010.
- 2137 Malaponte G, Bevelacqua V, Volti GL, Petrina M, Nicotra G, Sapuppo V, Volti SL,  
2138 Travali S, Mazzarino MC. Soluble Adhesion Molecules And Cytokines In Children  
2139 Affected By Recurrent Infections Of The Upper Respiratory Tract. **Pediatric**  
2140 **Research**, V. 55, N. p. 4, 2004.
- 2141 Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. **Proc Am Thorac Soc**, v. 2, n.  
2142 5. P. 403-11, 2005.
- 2143 Masten BJ. Initiation of lung immunity: the afferent limb and the role of dendritic cells.  
2144 **Semin Respir Crit Care Med**, v. 25, n. 1, p. 11-20.
- 2145 Maynard CL *et al.* Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3 +  
2146 and Foxp3 precursor cells in the absence of interleukin 10. **Nat. Immunol**, v. 8, p.  
2147 931–941, 2007.
- 2148 McNamara PS, Smyth RL. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in  
2149 childhood. **Br Med Bull**, v. 61, n. 1, p. 13-28, 2002.
- 2150 Mendoza N, *et al.* Existing antibacterial vaccines. **Dermatologic Therapy**. V. 22, p.  
2151 129–142, 2009.
- 2152 Montón C and Torres A. Lung inflammatory response in pneumonia. **Monaldi Arch**  
2153 **Chest Dis**, v. 53, p. 56–63, 1998.
- 2154 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL & O’Garra A. Interleukin-10 and the  
2155 interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol**, v. 19, p. 683–765, 2001.
- 2156 Moreira JS, Andrade, CF. Mecanismos de defesa do aparelho respiratório. In:  
2157 Tarantino AB, editor. Doenças pulmonares. 6ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-**  
2158 **Koogan**, 131-9, 2008.

- 2159 Munteanu An, Surcel M, HuicăRi, Isvoranu G, Constantin C, Pîrvulr, Chifiriuc C,  
2160 Ulmeanu C, UrsaciucC, Neagu M. Peripheral Immune Cell Markers In Children With  
2161 Recurrent Respiratory Infections In The Absence Of Primary Immunodeficiency.  
2162 **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 18, p. 1693-1700, 2019.
- 2163 O'Garra A & Vieira P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat.**  
2164 **Rev. Immunol**, v. 7, p. 425–428, 2007.
- 2165 Ochs HD, Stiehm ER. Antibody deficiencies. In: Steihm ER. ed. Immunologic  
2166 disorders in infants and children, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; p. 309-462,  
2167 2004.
- 2168 Ofer L. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates.  
2169 **Immunology**, p. 7, p. 379-90, 2007.
- 2170 Orimo K, Saito H, Matsumoto K, Morita H. Innate Lymphoid Cells in the Airways:  
2171 Their Functions and Regulators. **Allergy Asthma Immunol Res**, v. 12, n. 3, p. 381-  
2172 398, 2020.
- 2173 Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions  
2174 of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of**  
2175 **Immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.
- 2176 Owayed AF, Campbell DM, Wang EE. Underlying causes of recurrent pneumonia in  
2177 children. **Arch Pediatr Adolesc Med**. V. 154, n. 2, p. 190-4, 2000.
- 2178 Oxelius V, Laurell A, lindquist B, Golebiowska H, Axelsson U, BjorkanderJ, Hanson  
2179 LA. IgG subclasses in selective IgA deficiency. **N. Engl. J. Med**, v. 304, p. 1476,  
2180 1981.
- 2181 Oxelius V. Chronic infections in a family with hereditary deficiency of IgG 2 and IgG  
2182 4. **Clin. Exp. Immunol**, v. 17, p. 19, 1974.
- 2183 Pease JE and Sabroe I. The Role of Interleukin-8 and its Receptors in Inflammatory  
2184 Lung Disease. **Am J Respir Med**, v. 1, n. 1, p. 19-25, 2002.

- 2185 Pio, A.; Leowski, J. & Luelmo F. Programa dela Organización Mundial de la Salud de  
2186 infeccio-nes respiratorias agudas en la infancia. Boletín dela Oficina Sanitaria  
2187 Panamericana, v. 96, p. 283-285, 1984.
- 2188 Pizzutto SJ, Upham JW, Yerkovich ST, Chang AB. High pulmonary levels of IL-6 and  
2189 IL-1 $\beta$  in children with chronic supplicative lung disease are associated with low  
2190 systemic IFN- $\gamma$  production in response to non-Type able *Haemophilus influenzae*.  
2191 **PLOS ONE**, v. 10, p. 6, 2015.
- 2192 Posfay-Barbe KM, Barazzone-Argiroffo C, Siegrist CA. Recurrent lower respiratory  
2193 tract infection in children: when and how should they be investigated. **Rev Med**  
2194 **Suisse**, v. 1, n. 7, p. 493-8, 2005.
- 2195 Principi N, Esposito S, Cavagna R, Bosis S, Droghetti R, Faelli N. Recurrent  
2196 respiratory tract infections in pediatric age: a population-basedsurvey of the  
2197 therapeutic role of macrolides. **J Chemother**, v. 15, p. 53-9, 2003.
- 2198 Raniszewska A, Górska E, Kotuła I, Stelmaszczyk-Emmel A, PopkoK,Ciepiela O.  
2199 Recurrent Respiratory Tract InfectionsIn Children – Analysis of Immunological  
2200 Examinations. **Centr Eur J Immunol**, v. 40, n. 2, p. 167-173, 2015.
- 2201 RAO KR, GANDHI SS, KOKIWAR PR. Clinical study of recurrent respiratory tract  
2202 illness among pediatric patients. **Int J Contemp Pediatr**, v.3, n.1, p. 210-213, 2016.
- 2203 Roitt I, Brostoff J, Male D. **Immunology**. Mosby Elsevier, 1996; 4th Ed;420.
- 2204 Roper MH, Vandelaer JH, GASSE FL. Maternal and neonatal tetanus. **Lancet**, v. 370  
2205 n. 9603, p. 1947–1959, 2007.
- 2206 Rothewell NJ. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends**  
2207 **Pharmacol Sci**, v. 12, p. 430-436, 1991.
- 2208 Ruuskanen O, Nurkka A, Helminen M, Viljanen MK, Käyhty H, Kainulainen L.  
2209 Specific antibody deficiency in children with recurrent respiratory infections: a  
2210 controlled study with followup. **Clin. Explimmunol**, v. 172, n. 2, p. 238-44, 2013.
- 2211 Sande CJ, Njunge JM, Ngoi JM, Mutunga MN, Chege T, Gicheru ET, Gardiner EM,  
2212 Gwela A, Green CA, Drysdale SB, Berkley JA, Nokes DJ, Pollard AJ. Airway

- 2213 response to respiratory syncytial virus has incidental antibacterial effects. **Nature**  
2214 **Communication**, v. 10, p. 2218, 2019.
- 2215 Sattler AEMB. The role of the immune system beyond the fight against infection.  
2216 **Cardiovascular Immunology**, v.1, p. 1-17, 2017.
- 2217 Schaad UB, Esposito S, Razi CH. Diagnosis and Management of Recurrent  
2218 Respiratory Tract Infections in Children: A Practical Guide. **Arch Pediatr Infect Dis**,  
2219 v. 4, n. 1, p. e 31039, 2015.
- 2220 Schatzmayr HG. New Perspectives In Viral Vaccines. **História, Ciências, Saúde.**  
2221 **Manguinhos**. v. 10, Sup 2, p. 655-69, 2003.
- 2222 Schur PH, Borel H, Gelfand EW, Alper CA, Rosen FS. Selective gamma-g globulin  
2223 deficiencies in patients with recurrent pyogenic infections. **N Engl J Med**, v. 17, n.  
2224 283(12), p. 631-4, 1970.
- 2225 Scully C, Georgakopoulou EA, Hassona Y. The Immune System: Basis of so much  
2226 Health and Disease: Adaptive Immunity. **Dent Up date**, v. 44, n. 4, p. 322-327, 2017.
- 2227 Shackelford PG, Granoff DM, Madassery JV, Scott MG, Nahm MH. Clinical and  
2228 immunologic characteristics of healthy children with subnormal serum concentrations  
2229 of IgG2. **Pediatr Res**, v. 27, n.1, p. 16-21, 1990.
- 2230 Siebert JN, L'huillier AG, Grillet S, Delhumeau C, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM.  
2231 Memory B cell compartment constitution and susceptibility to recurrent lower  
2232 respiratory tract infections in young children. **J Leukoc Biol**, v. 93, n. 6, p. 951- 62  
2233 2013.
- 2234 Silva GP. Infecções Respiratórias Agudas. Especialização em Saúde da Família.  
2235 **UNA-SUS**. 2015.
- 2236 Sorensen RU, Moore C. Immunology in the pediatrician's office. **Pediatr Clin**. v. 41,  
2237 p. 691-714, 1994.
- 2238 Souba WW. Cytokine control of nutrition and metabolism during critical illness.  
2239 **CurrProbl Surg**, v. 31, p. 577-643, 1994.

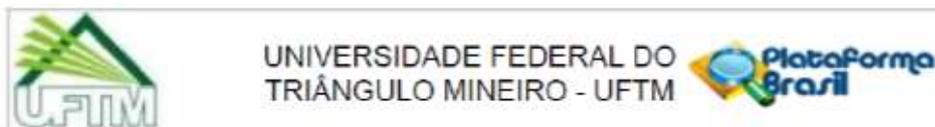
- 2240 Speigelberg HL. Biological activities of immunoglobulins of different classes and  
2241 subclasses. **Adv. Immunol**, v. 19, p. 259, 1974.
- 2242 Stanley PJ, Corbo G, Cole PJ. Serum IgG subclasses in chronic and recurrent  
2243 respiratory infections. **Clin. exp. Immunol**, v. 58, p. 703-708, 1984.
- 2244 Stiehm ER. The four most common Pediatric immunodeficiencies. Journal of  
2245 Immunotoxicolog, v. 5, p. 227-34, 2008.
- 2246 Van Kessel DA, Horikx PE, Van Houte AJ, De GraaffC S, Van Velzen-Blad H, Rijkers  
2247 GT. Clinical and immunological evaluation of patients with mild IgG1 deficiency. **Clin**  
2248 **Exp Immuno**, v. 118, p. 102–107, 1999.
- 2249 Vangeti S, Yu M, Smed-Sörensen A. Respiratory Mononuclear Phagocytes in Human  
2250 Influenza A Virus Infection: Their Role In Immune Protection And As Targets Of The  
2251 Virus. **Front. Immuno**, v. 9, p. 1521, 2018.
- 2252 Victora CG; Barros FC, Vaugahn JP. Epidemiologia da Desigualdade. São Paulo,  
2253 **Editora Hucitec**, 1988.
- 2254 Vieira RA, Diniz EMA, Ceccon MEJR. Correlation between inflammatory mediators in  
2255 the nasopharyngeal secretion and in the serum of children with lower respiratory tract  
2256 infection caused by respiratory syncytial virus and disease severity. **J Bras**  
2257 **Pneumol**, v, 36, n. 1, p. 59-66, 2010.
- 2258 Yount WJ, Kunkel HG, Litwin SD. Studies of the Vi (y2c) subgroup of y globulin. A  
2259 relationship between concentration and genetic type among individuals. **J. Exp. Med**,  
2260 v. 125, p. 177, 1967.
- 2261 Zwahlen R, Walz A, Rot A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human  
2262 interleu-kin-8 and related peptides. **Int Rev Exp Pathol**, v. 34, p. 27-42, 1993.
- 2263
- 2264
- 2265
- 2266

2267 **ANEXOS**

2268 **Anexo 1**

2269 **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: APROVAÇÃO DO PROJETO**

2270



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA EM CRIANÇAS DE 1 A 6 ANOS DE IDADE COM E SEM EPISÓDIOS DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS DE REPETIÇÃO.

**Pesquisador:** Virmondes Rodrigues Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 61396916.0.0000.5154

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.821.411

2271

2272

2273

2274

2275

2276

2277

2278

2279

2280

2281 **Anexo 2**2282  
2283  
2284  
2285  
2286  
2287  
2288  
2289

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG**  
**Comitê de Ética em Pesquisa- CEP**  
Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia  
CEP: 38025-100 – Uberaba (MG)  
Telefone: (0\*\*34) 3700 6776- E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

2290  
2291 **Título do Projeto:** ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA EM  
2292 CRIANÇAS DE 1 A 6 ANOS DE IDADE COM E SEM EPISÓDIOS DE INFECÇÕES  
2293 RESPIRATÓRIAS DE REPETIÇÃO2294  
2295  
2296**TERMO DE ESCLARECIMENTO**2297 A criança sob sua responsabilidade está sendo convidada a participar do estudo:  
2298 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA EM CRIANÇAS DE 1 A 6  
2299 ANOS DE IDADE COM E SEM EPISÓDIOS DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS DE  
2300 REPETIÇÃO, por apresentar infecção respiratória de repetição. Os avanços na área das ciências  
2301 ocorrem através de estudos como este, por isso a participação da criança é importante. O objetivo  
2302 deste estudo é analisar as características da resposta imune em crianças que podem deixar a  
2303 criança susceptível a sofrer várias infecções respiratórias. Caso a criança participe, será necessário  
2304 realizar um exame de sangue e responder algumas perguntas sobre a situação de infecções  
2305 anteriores. A criança poderá ter algum desconforto quando receber uma picada para colher o  
2306 sangue, mas o procedimento não trará riscos para a saúde, pois o profissional é treinado para a  
2307 realização da coleta e todo o material utilizado é estéril. Este exame poderá ser realizado no  
2308 momento da retirada de sangue para outros exames necessários às avaliações da criança. A criança  
2309 não terá benefícios diretos nesta pesquisa, entretanto, indiretamente ela aumentará o conhecimento  
2310 sobre as infecções respiratórias, que poderão beneficiá-la e a outras crianças de mesma faixa  
2311 etária.2312 Você e a criança sob sua responsabilidade poderão obter todas as informações que  
2313 quiserem; a criança poderá ou não participar da pesquisa e o seu consentimento poderá ser  
2314 retirado a qualquer momento. Pela participação da criança no estudo, você nem a criança  
2315 receberão qualquer valor em dinheiro, mas haverá a garantia de que todas as despesas necessárias  
2316 para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. O nome da criança não aparecerá  
2317 em qualquer momento do estudo, pois ela será identificada por um número ou por uma letra ou  
2318 outro código.

2319

2320 **Anexo 3**

2321

2322

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE APÓS ESCLARECIMENTO**

2323

2324 Título do Projeto: ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA EM  
2325 CRIANÇAS DE 1 A 6 ANOS DE IDADE COM E SEM EPISÓDIOS DE. INFECÇÕES  
2326 RESPIRATÓRIAS DE REPETIÇÃO

2327 Eu, \_\_\_\_\_, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e  
2328 compreendi para que serve o estudo e qual procedimento ao qual a criança sob minha responsabilidade  
2329 será submetida. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que eu  
2330 e a criança sob minha responsabilidade somos livres para interromper a participação dela na pesquisa a  
2331 qualquer momento, sem justificar a decisão tomada e que isso não afetará o tratamento dela. Sei que o  
2332 nome da criança não será divulgado, que não teremos despesas e não receberemos dinheiro por  
2333 participar do estudo. Eu concordo com a participação da criança no estudo, desde que ele também  
2334 concorde. Após assinatura, receberei uma via (não fotocópia) deste documento acima.

2335

2336 ....., ...../ ...../.....

2337

2338

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal\_\_\_\_\_  
Documento de Identidade

2340

2341

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador orientador

2343

2344 **Telefone de contato dos pesquisadores:**2345 **Dr. Virmondes Rodrigues Jr. (Laboratório de Imunologia – UFTM): (34) 33185299**2346 **Natália Vieira Inácio Calapodopulos: (HC – UFTM): (34) 99963 5161**

2347

2348 Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê  
2349 de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo telefone (34) 3700 6776.

2350

2351

2352

2353

2354

## 2355 Anexo 4

2356

## QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

## 1. CARACTERIZAÇÃO

NOME DO PACIENTE	
RG DO HOSPITAL	
IDADE	
NOME DA MAE/ RESPONSÁVEL	
NOME DO PAI/RESPONSÁVEL	

## 2. ANTECEDENTES MÓRBIDOS

6 OU MAIS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS POR ANO	SIM ( ) NAO ( ) QUAIS? QUANDO? ANTIBIÓTICOS USADOS DURAÇÃO MÉDIA DAS INFECÇÕES
1 OU MAIS INFECÇÕES DE VIAS AÉREAS SUPERIORES POR MÊS DE SETEMBRO A ABRIL	SIM ( ) NAO ( ) QUAIS? QUANDO? ANTIBIÓTICOS USADOS DURAÇÃO MÉDIA DAS INFECÇÕES
3 OU MAIS INFECÇÕES DE VIAS AÉREAS INFERIORES POR ANO	SIM ( ) NÃO ( ) QUAIS? QUANDO? ANTIBIÓTICOS USADOS DURAÇÃO MÉDIA DAS INFECÇÕES
NECESSITOU DE INTERNAÇÃO	SIM ( ) NAO ( ) QUANDO? CAUSA? QUAL ANTIBIÓTICO? QUANTO TEMPO? QUANTAS VEZES?
IDADE DA PRIMEIRA INFECÇÃO E QUAL FOI	IDADE INFECÇÃO PRECISOU INTERNAÇÃO NESTA? SIM ( ) NÃO

## 3. ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS

INTERCORRÊNCIAS NO PRÉ NATAL	SIM	NÃO	ESPECIFICAR
SANGRAMENTO			
INFECÇÕES			
TABAGISMO			TEMPO:
OUTROS			

## 4. CONDIÇÕES DE NASCIMENTO

	NORMAL	CESAREA	ESPECIFICAR
VIA DE PARTO			

2357

2358

2359

2360

2361

IDADE GESTACIONAL	PESO	ESTATURA	PC	APGAR

TESTES DE TRIAGEM (CORÇÃO, OLHO, ORELHINHA E PEZINHO)	NORMAL	ALTERADO	ESPECIFICAR
---	--------	----------	-------------

CUIDADOS ESPECIAIS APOS NASCIMENTO	SIM	NAO	ESPECIFICAR
------------------------------------	-----	-----	-------------

## 5. ANTECEDENTES PESSOAIS

ALEITAMENTO MATERNO EXCLUSIVO ATE QUAL IDADE	
APOS ATE QUAL LEITE USADO	
INTRODUÇÃO DE LEITE DE VACA INTEGRAL APOS QUAL IDADE	
IDADE DE INICIO EM BERÇARIO	
IDADE DE INICIO EM CRECHE	
IDADE DE INICIO EM ESCOLA	
HISTORIA DE PAIS OU IRMAOS COM ASMA/RINITE/DERMATITE ATÓPICA OU OUTRAS	SIM ( ) NÃO ( ) QUEM E QUAL?
HISTÓRIA DE ALERGIA	SIM ( ) NÃO ( ) QUAL?
ALTERAÇÕES ANATÔMICAS OU FUNCIONAIS DAS VIAS AÉREAS (HIPERTROFIA DE AMIGDALAS, ADENÓIDES)	SIM ( ) NÃO ( ) QUAL?
HISTÓRIA DE DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO	SE SIM, COM QUAL IDADE?
NIVEL DE ATIVIDADE FISICA	
ALIMENTAÇÃO ADEQUADA EM QUALIDADE DE ALIMENTOS	SIM ( ) NÃO ( ) PQ?
ALIMENTAÇÃO ADEQUADA EM QUANTIDADE DE ALIMENTOS	SIM ( ) NÃO ( ) PQ?
ALIMENTAÇÃO ADEQUADA EM VARIEDADE DE ALIMENTOS	SIM ( ) NÃO ( ) PQ?
ESTADO NUTRICIONAL ADEQUADO	SIM ( ) NÃO ( ) PQ?
CARTÃO DE VACINAS COMPLETO	SIM ( ) NÃO ( ) PQ?
USO DE ANTIPARASITARIOS	SIM ( ) NÃO ( ) QUAL? QUANDO?

## 6. HÁBITOS E CONDIÇÕES DE VIDA

NUMERO DE IRMAOS EM IDADE ESCOLAR	
NUMERO DE PESSOAS NA CASA	
CASA COM HIGIENIZAÇÃO ADEQUADA (AGUA TRATADA/MOFO/UMIDADE)	SIM ( ) NÃO ( ) PQ?
TABAGISTAS NO DOMICILIO	SIM ( ) NÃO ( )
POSSUI ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO (GATO/CÃO)	SIM ( ) NÃO ( )