UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

CAROLINA AUGUSTA ARANTES PORTUGAL

Avaliação das concentrações da interleucina 33 e do receptor ST2 em secreções respiratórias e no plasma de crianças com bronquiolite viral aguda e sua associação com a gravidade da doença

TESE DE DOUTORADO

Ribeirão Preto

2018

CAROLINA AUGUSTA ARANTES PORTUGAL

Avaliação das concentrações da interleucina 33 e do receptor ST2 em secreções respiratórias e no plasma de crianças com bronquiolite viral aguda e sua associação com a gravidade da doença

Versão Corrigida

(A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD))

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Paula de Carvalho Panzeri Carlotti

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Portugal, Carolina Augusta Arantes
Avaliação das concentrações da interleucina 33 e do receptor ST2 em secreções respiratórias e no plasma de crianças com bronquiolite viral aguda e sua associação com a gravidade da doença. Ribeirão Preto, 2018.
112p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Orientador: Carlotti, Ana Paula de Carvalho Panzeri.

1. Bronquiolite viral aguda. 2. Marcadores inflamatórios. 3. Interleucina 33. 4. ST2 solúvel. 5. Crianças.

PORTUGAL, CAA. **Avaliação das concentrações da interleucina 33 e do receptor ST2 em secreções respiratórias e no plasma de crianças com bronquiolite viral aguda e sua associação com a gravidade da doença.** 2018. 112 f. Tese (Doutorado em ciências) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Da Criança e Do Adolescente, Departamento de Puericultura e Pediatria, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para eu chegar onde cheguei hoje, principalmente aos seres humanos e caninos que me fazem ter um lugar para chamar de lar!

Agradecimentos

Na madrugada em que fui me deitar, finalmente, com a impressão de que estava terminando a confecção deste trabalho, precisava me distrair com algo. Num documentário para TV, um *showman* declamava as idéias de um filósofo, Alan W. Watts, sobre o qual eu só havia ouvido remotamente:

> *Life is like music for its own sake. We are living in an eternal now, and when we listen to music we are not listening to the past, we are not listening to the future, we are listening to an expanded present.*

A felicidade nos é vendida na condicional de atingirmos um certo objetivo, continuou. Porém, assim como não se começa a ouvir uma música pelo final, ou não se começa a leitura de um livro por seu último capítulo, a vida também não representa um fim e, sim, uma melodia que devemos aprender a curtir, feita de momentos alegres ou tristes.

Os últimos quatro anos me ajudaram a entender o que o *showman*, através das palavras do tal filósofo, estava tentando passar para a audiência: que o momento, sendo ele de dificuldade, suor e tristeza, ou de alívio e felicidade, é o que representa sua história. E sua história está ao alcance de suas mãos, representada pelo presente concreto do dia-a-dia, do estudo, do esforço, do trabalho, do lazer, do convívio com outras pessoas e outras histórias, e não por um futuro abstrato, impalpável e incerto.

Meu presente é constituído por um sentimento de cansaço, um início de alívio, mas, principalmente, de contínua gratidão às inúmeras pessoas cujas histórias se cruzaram, em diversos momentos, com a minha própria história, durante toda a jornada.

Agradeço a meus pais, que incutiram em mim sentimentos de coragem, determinação e vontade de aprender. Valorizo, além dos carinhos e cuidados, a oportunidade que me proporcionaram para que eu pudesse expandir meus horizontes e formar uma mente crítica. Embora eu lamente um pouco não ter a presença física do meu pai e de meu irmão mais velho, gosto de pensar que, de alguma forma, em algum lugar, estão assistindo a tudo, rindo, me zoando, xingando ou orgulhosos, mas fazendo parte também deste eterno agora. Agradeço à minha mãe, a "vovó" mais tchutchuca que já andou por estas terras, por ter sido capaz de confiar na

criação que deu a sua única filha, mesmo quando eu optei por abrir mão do conforto de sua proximidade, de um concurso público estadual e uma carreira docente na Universidade pública local em Juiz de Fora, lugar que meus pais tanto se doaram durante toda vida, para iniciar tudo de novo, em terras um pouquinho distantes (longe e demorado para se chegar de carro e cara para se chegar de avião *rs*). Agradeço ao Augusto, que, mesmo de longe, está sempre perto para oferecer um conselho sensato!

Minha vida aqui em Ribeirão, claro, não podia deixar de ter emoções, um começo difícil, com muita solidão e tudo o mais que a vida deve ter. Não fossem os amigos e colegas da época da residência que ficaram por aqui e que se tornaram também minha família, tudo ia ter sido bem mais árduo: no início, havia as amigas Ana Cláudia e Sabrina, que sempre me faziam companhia nos finais-de-semana solitários. Depois, a Dri, que eu acho o maior barato que está sempre disposta a um almoço ou jantar e um bom papo sobre as dificuldades da vida, além de ter sido minha companhia em algumas disciplinas da pós-graduação. Inclusive, me lembro com muita empolgação da minha primeira matéria, de metodologia e prática docente, pois era uma turma pequena e que às vezes me remetia à pré-escola, com tantas colagens, cartolinas e caixas de lápis de cor, pelo menos foi isso que me marcou. Quer dizer, isso e o "trio mais legal da pós", eu, Enzo e Carol da biologia, simplesmente porque o Enzo é uma das pessoas mais maneiras que já conheci e a Carol foi uma dessas histórias legais com as quais eu cruzei. Quanto às demais disciplinas que eu fiz por aqui, gostei das aulas de metodologia da Professora Marisa, pois me ajudaram a "desanuviar" o desenho do meu estudo, mesmo com intermináveis exercícios sobre os diversos tipos de estudo. No fim, acabei solidificando e amadurecendo a leitura crítica de artigos científicos. Mais para o final do curso, fiz a disciplina de nutrição na criança gravemente enferma com as Professoras Ana Paula e Jaqueline e foi uma experiência deliciosa (*no pun intended - rs*): tive meu primeiro contato com as ciências ômicas e uma nova interpretação de ciência se revelou para mim. De quebra, ainda pude gastar meu inglês, que eu sinto tanta falta de praticar. Por mim, poderiam ter mais disciplinas assim: mais maduras e enriquecedoras, tanto do ponto de vista pessoal, quanto intelectual.

O período em que coletei os materiais para meu estudo foi bastante árduo.

Aqui cabem vááááários e esfuziantes agradecimentos: à equipe da UPC, da farmacologia e do laboratório de virologia, aos familiares e crianças "dodóis" que me permitiram a oportunidade de concluir este trabalho e também em trazer um pouco mais de conhecimento sobre as doenças respiratórias virais da infância. À equipe de enfermagem da enfermaria, MI e CTI. Porém, um agradecimento especial deve ser feito à enfermeira-chefe Juliana, que, sem pedir nada em troca, coletou várias amostras de sangue pra mim, foi muito legal.

Preciso também dedicar todo um parágrafo à equipe da fisioterapia, em especial à Karininha, tão competente e comprometida, porém sem deixar de citar a Paula (é demais!), Carol's (sempre sorrindo!), Lu (-iza, figurinha e competente!), Gaby's (e sua camiseta maneiríssima de "bad hair day" do Snoopy, que sempre alegrou meu dia e seu jeitinho que ainda melhora meu humor até hoje!), Malba (quietinha e competente), Mari (s), Rô, estou com medo de não me lembrar de todas, mas não porque não foram importantes e sim porque tenho memória ruim mesmo!

Ainda sobre a enfermaria, preciso agradecer à Professora Palmira, que, além de muitos ensinamentos, me apoiou neste projeto e durante todas as disciplinas matutinas cursadas. Também preciso agradecer aos residentes, que foram pacientes durante as várias manhãs que eu desaparecia no laboratório, para processar minhas amostras a tempo.

Dentre os departamentos que me apoiaram, agradeço ao Professor Zeca (que insiste de eu chamá-lo assim hehe), paciente em seu apoio intelectual e que rapidamente me inspirou a ter um fascínio pelo mundo da resposta inflamatória. Aos colegas pesquisadores da virologia, em especial à Talita, que foi a pessoa que mais teve paciência, me ensinou e instruiu sobre os procedimentos do laboratório. À Mirela e, agora mais ao final, ao Ítalo, que foi quem mais tolerou os meus momentos "Burro" do desenho "Shrek", perguntando por mensagens, ou pessoalmente, "e agora, já estão prontas? E agora? E agora?". Santa paciência *rsrsrsrs*.

Falando em paciência, quando senti que estava amadurecendo, disse a mim mesma "demorei, atrasei, dei o melhor de mim, mas consegui" e, em uma única tarde, essa minha história do Doutorado deu uma guinadinha, para me mostrar que, em matéria de produção científica, pelo menos, ainda sou uma bebê prematura extrema.

Como bebê que sou, até chorei, né, Professora?! E, cada vez que penso naquela tarde que fui ao hospital já meio esperando que meu trabalho estava beeeem longe do que poderia se tornar, me dá uma sensação de "vergoinha" de mim mesma. Afinal, já estava me achando tão "adulta" e competente! Ha-ha-ha, ledo engano! Bastou uma conversa com a Professora para dizer a mim mesma: "sabe de nada, inocente". E, desde que entrei para a residência, imaginem, há 13 anos (!), vi muitos colegas se inspirarem, assim como a mim, com a competência, inteligência e comprometimento que contribuíram para tornar o serviço de terapia intensiva pediátrica a instituição respeitada que se tornou hoje. Todos os dias fico feliz de ter me encontrado neste trabalho que eu amo tanto e que só se tornou possível graças aos exemplos de profissionais com os quais tive o privilégio de aprender e também agradeço à equipe da qual agora faço parte, com bastante orgulho. Por tudo isso que ainda não tinha tido oportunidade de expressar, e pela oportunidade dada a mim ao me tornar aluna no Doutorado, gostaria de agradecer à Professora Ana Paula, por ter confiado a mim a responsabilidade deste trabalho e por ter me guiado e inspirado a querer fazer melhor, estudar mais e descobrir todo um novo mundo a explorar, mesmo com tantos obstáculos. Gostaria de me desculpar pelas minhas limitações, queria muito conseguir fazer melhor! E não me esqueço do dia da prova para ingressar na pós, há 4 anos, quando me atrasei porque meu cachorro, Bernardo, ainda com 45 dias de vida, havia ficado doente e eu tinha acabado de interná-lo. A senhora foi extremamente compreensiva, apesar do meu atraso, o que me deu bastante confiança para dar o máximo de mim, tanto naquele momento, como nos anos posteriores.

Falando em Bernardo, puxa, que companheirões eu tenho! Para quem não tem animais de estimação, não parece muito, mas é impressionante como, em todos os momentos da minha história recente, estão eles por aqui, pertinho de mim. Bernardo e seu jeito marrento, mas como gosta de mim e me defende hehe! Lupin, sempre pronto com um brinquedo na boca pra eu jogar, ou com uma barriguinha para oferecer para ganhar carinho! Já a Gigi, virou a companheirona da tese, porque ô bichinho grudado! Por último, mas não menos importante, Totó, que, mais sensível e inteligente, sempre tinha um abraço de urso e lambida pra me dar nos momentos de desespero...

Pessoas cujas histórias me ensinaram sobre amizade e que, ou já eram, ou se tornaram minha família aqui em Ribeirão: amiga-irmã Fabíola, Vivi, Leila (minha consultora para assuntos "pós-graduísticos"), meninas e meninos do grupo "quadribol" e agradecimento especial à Nah, que até conferir contagens nas minhas tabelas se dispôs! Além disso, se tornou nossa companheira daquele vinho e bate-papo durante os períodos mais cansativos.

Palavras como amizade e companheirismo já me remetem automaticamente à Amanda, pessoa que, se não estivesse ao meu lado durante todo esse período, não conseguiria estar aqui terminando essa tese. O problema é que fica difícil expressar em poucas palavras toda a paciência, maturidade, amizade e apoio que eu recebi, mesmos nos momentos em que ambas estávamos cansadas e estressadas. Pode não parecer (preciso de férias!), mas fica aqui registrada minha mais profunda gratidão, porque sem você pra me ajudar neste período, eu já seria só o pózinho da rabiola numa hora dessas! Cuidou da casa, dos cães, da comida, das contas, ixi, seria um capítulo à parte para contar tudo!

Por fim (espero não ter me esquecido de ninguém), seguiremos a vida, rumo ao próximo desafio ou às merecidas férias, quem sabe?! Mas vamos focar no agora, ou, como minha mãe gosta de dizer, "Carolina, tudo a seu tempo"....

“Do. Or do not. There is no try.”

Master Yoda, in The Empire Strikes Back

Resumo

Avaliação das concentrações da interleucina 33 e do receptor ST2 em secreções respiratórias e no plasma de crianças com bronquiolite viral aguda e sua associação com a gravidade da doença.

Contexto: Os mecanismos inflamatórios que determinam a gravidade da bronquiolite viral aguda em crianças ainda não estão bem estabelecidos e parecem relacionados à disfunção da resposta imune. **Objetivos:** Avaliar a associação da interleucina-33 e do receptor ST2 com a gravidade da bronquiolite viral aguda. **Métodos:** Concentrações de IL-33, ST2, IL- 1ß, TNFα, IL-4, IL-6 e IL-8 foram avaliadas em secreção nasofaríngea e plasma de pacientes com bronquiolite viral aguda em dois momentos da internação hospitalar. A necessidade de ventilação mecânica constituiu o critério de gravidade da doença. **Resultados:** De janeiro de 2015 a dezembro de 2016, 261 crianças foram internadas com diagnóstico de bronquiolite viral aguda. Setenta e nove crianças foram incluídas no estudo; 33 (41,7%) foram submetidas à ventilação mecânica. Cento e oitenta e dois pacientes (69,7%) foram excluídos pelos seguintes motivos: uso de corticoide > 24h (n=156), múltiplas comorbidades (n=7), falha de recrutamento (n=11) e recusa dos responsáveis (n=8). Não houve associações entre etiologias virais ou presença de coinfecções e gravidade da doença. Verificaram-se detecções mais frequentes da IL-33 em secreção nasofaríngea à admissão hospitalar de pacientes submetidos à ventilação mecânica comparados com aqueles que não necessitaram de ventilação mecânica (50% vs. 13,3%, respectivamente; p<0,001). Observou-se o mesmo para o ST2 (87,5% no grupo submetido à ventilação vs. 40,9% no grupo não submetido à ventilação; p< 0,001). Na análise do quinto dia de internação entre os dois grupos, verificaram-se valores mais elevados em secreção nasofaríngea da IL-6 (mediana 152,6 pcg/ml no grupo submetido à ventilação vs. mediana 14,4 pcg/ml no grupo não submetido à ventilação; p=0,001) e IL-8 (mediana 1113 pcg/ml no grupo submetido à ventilação e mediana 792,2 pcg/ml no grupo não submetido à ventilação; p=0,03). Na comparação em secreção nasofaríngea entre os dois períodos de coleta, pacientes que necessitaram ventilação mecânica apresentaram redução das concentrações de ST2 (mediana 5,63 pcg/ml à admissão e mediana 2,44 pcg/ml no quinto dia de internação hospitalar; p=0,03) e aumento das concentrações de IL-4 (mediana 0,2 pcg/ml à admissão e mediana 6,9 pcg/ml no quinto dia; p<0,01) e IL-8 (mediana 342,9 pcg/ml à admissão e mediana 1.113 pcg/ml no quinto dia; p<0,01). Na análise entre os dois momentos de coleta no grupo não submetido à ventilação, demonstraram-se incrementos das concentrações em secreção nasofaríngea da IL-4 (mediana 0,2 pcg/ml à admissão e mediana 5,3 pcg/ml no quinto dia; p<0,01) e IL-8 (mediana 300,2 pcg/ml à admissão e mediana 792,2 pcg/ml no quinto dia; p<0,01), acompanhados de redução da IL-6 (mediana 86,0 pcg/ml à admissão e

Resumo

mediana 14,4 pcg/ml no quinto dia; p=0,04) e de incremento nas concentrações séricas da IL-33 (mediana 0,186,0 pcg/ml à admissão e mediana 36,2 pcg/ml no quinto dia; p=0,04). **Conclusão:** Detecções mais frequentes da IL-33 e do receptor ST2 durante a admissão hospitalar e concentrações elevadas de IL-6 e IL-8 em secreção nasofaríngea durante o quinto dia da internação foram associadas à gravidade da bronquiolite viral aguda. Não houve associação entre as etiologias virais ou a presença de coinfecções e a gravidade da doença.

Palavras-chave: Bronquiolite viral aguda. Marcadores inflamatórios. Interleucina 33. ST2 solúvel. Crianças.

Abstract

Evaluation of interleukin-33 and receptor ST2 levels in respiratory aspirates and plasma of children with acute viral bronchiolitis and their association with disease severity

Background: The inflammatory mechanisms influencing the severity of acute viral bronchiolitis in children are still not well established and seem to be caused by an immune dysfunction. **Objectives:** To assess if interleukin-33 and its receptor, ST2, can be used as clinical severity biomarkers in acute viral bronchiolitis. **Methods:** Levels of IL-33, ST2, IL-1ß, TNFα, IL-4, IL-6 e IL-8 were analyzed in nasopharyngeal aspirates and blood plasma of patients in two different moments after hospital admission. Severity of disease was defined by the presence of mechanical ventilation. **Results:** From January 2015 to December 2016, 261 were admitted due to acute viral bronchiolitis. Of the 79 children included in the study, 33 (41,7%) were submitted to mechanical ventilation. One hundred and eighty-two patients (69,7%) were excluded, due to use of corticosteroids (n=156), pre-existing comorbidities (n=7), recruitment failure (n=11) and parents refusal (n=8). No associations between viral etiology or the presence of coinfecctions and severity of disease were observed. IL-33 was more frequently detected in nasopharyngeal aspirates of patients submitted to mechanical ventilation during hospital admission (50% of samples of the mechanically ventilated group vs. 13,3% of the samples of children with no need of ventilator support; p<0,001). The same correlation was observed in ST2 levels (87,5% in the mechanically ventilated group vs. 40,9% of samples of children with no need of ventilator support; p< 0,001). On day five post-admission, an increase in concentrarions of nasopharyngeal aspirates in the mechanically ventilated patients was detected for IL-6 (median 152,6 pcg/ml in the mechanically ventilated group and median 14,4 pcg/ml for the group with no need of ventilator support; p=0,001) and IL-8 (median 1.113 pcg/ml in the mechanically ventilated group and median 792,2 pcg/ml for the group with no need of ventilator support; p=0,03). Between admission and day 5, increases of IL-4 (median 0,2 pcg/ml on admission and median 6,9 pcg/ml on day 5; p<0,01) and IL-8 (median 342,9 pcg/ml on admission and median 1.113 pcg/ml on day 5; p<0,01) levels were detected in nasopharyngeal aspirates, whereas ST2 levels showed a decrease (median 5,63 pcg/ml on admission and median 2,44 pcg/ml on day 5; p=0,03). In the same analysis performed in nasopharyngeal aspirates of patients with no need of ventilation support, an increase in IL-4 (median 0,2 pcg/ml on admission and median 5,3 pcg/ml on day 5; p<0,01) and IL-8 (median 300,2 pcg/ml on admission and median 792,2 pcg/ml on day 5; p<0,01) levels was observed and a decrease in IL-6 levels (median 86,0 pcg/ml on admission and median 14,4 pcg/ml on day 5; p=0,04), along with an increase in IL-33 blood plasma levels (median 0,186 pcg/ml on admission and median 36,2 pcg/ml on day 5; p=0,04)

Abstract

were also shown. **Conclusion:** More frequent detections of IL-33 and ST2 on the day of admission and higher IL-6 and IL-8 levels in nasopharyngeal aspirates were associated with more severe forms of acute viral bronchiolitis. No correlations between viral etiologies or the presence of coinfecctions and severity of disease were observed.
Keywords: Acute viral bronchiolitis. Inflammatory biomarkers. Interleukin 33. Soluble ST2. Child.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Fluxograma do estudo..... 42

Figura 2 - Distribuição de vírus detectados isoladamente em secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite viral aguda pela técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real. VSR, vírus sincicial respiratório; HRV, rinovírus humano; HMPV, metapneumovírus humano; FLU, vírus influenza; HAD, adenovírus humano. 46

Figura 3 - Curva ROC da concentração de IL-6 em secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o quinto dia de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica. 54

Figura 4 - Curvas ROC da concentração de IL-33 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica. 89

Figura 5 – Curvas ROC da concentração de sST2 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica. 90

Figura 6 – Curvas ROC da concentração de IL-1ß em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica. 91

Figura 7 – Curvas ROC da concentração de IL-4 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica. 92

Figura 8 – Curvas ROC da concentração de IL-6 em secreção nasofaríngea (A e B)

Lista de ilustrações

e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica. 93

Figura 9 - Curvas ROC da concentração de IL-8 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica. 94

Lista de tabelas

Tabela 1 - Escore de Gravidade Clínica durante a internação 39

Tabela 2 - Escore de Gravidade Clínica à admissão 39

Tabela 3 - Comparação dos pacientes incluídos no estudo, de acordo com a necessidade ou não de ventilação mecânica 44

Tabela 4 - Prevalência de detecções virais por reação de polimerase em cadeia em tempo real em amostras de secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite viral aguda (n=79) 46

Tabela 5 – Número de amostras de secreções respiratórias de pacientes com bronquiolite viral aguda com detecção de mais de um vírus por reação de polimerase em cadeia em tempo real 47

Tabela 6 – Prevalência dos vírus identificados por reação de polimerase em cadeia em tempo real nos grupos ventilação mecânica (VM) e não VM e sua associação com a gravidade da doença, expressa por riscos relativos e intervalos de confiança 47

Tabela 7 – Comparação entre os grupos ventilação mecânica (VM) e não VM quanto à infecção por vírus único e co-infecção com 2 ou mais vírus 48

Tabela 8 - Concentração de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 em aspirado nasofaríngeo de crianças internadas por bronquiolite viral aguda, nas primeiras 24h de internação (T1), de acordo com presença (VM) ou ausência de ventilação mecânica (não VM) 48

Tabela 9 - Concentração de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 no plasma de crianças internadas por bronquiolite viral aguda, nas primeiras 24h de internação (T1), de acordo com presença (VM) ou ausência de ventilação mecânica (não VM) 49

Tabela 10 - Concentração de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 em aspirado nasofaríngeo de crianças internadas por bronquiolite viral aguda, no quinto dia de internação (T2), de acordo com presença (VM) ou ausência de ventilação mecânica (não VM) 49

Lista de tabelas

Tabela 11 - Concentração de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 no plasma de crianças internadas por bronquiolite viral aguda, no quinto dia de internação (T2), de acordo com presença (VM) ou ausência de ventilação mecânica (não VM)..... 49

Tabela 12 - Comparação entre as concentrações de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 em aspirado nasofaríngeo nos dois tempos de coleta, durante as primeiras 24h de internação (T1) e no quinto dia de internação (T2), no grupo de pacientes submetidos à ventilação mecânica (VM)..... 51

Tabela 13 – Comparação entre as concentrações de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 no plasma nos dois tempos de coleta, durante as primeiras 24h de internação (T1) e no quinto dia de internação (T2), no grupo de pacientes submetidos à ventilação mecânica (VM)..... 51

Tabela 14 - Comparação entre as concentrações de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 em aspirado nasofaríngeo nos dois tempos de coleta, durante as primeiras 24h de internação (T1) e o quinto dia de internação (T2), no grupo de pacientes não submetidos à ventilação mecânica (não-VM) 52

Tabela 15 – Comparação entre as concentrações de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 no plasma nos dois tempos de coleta, durante as primeiras 24h de internação (T1) e o quinto dia de internação (T2), no grupo de pacientes não submetidos à ventilação mecânica (não-VM)..... 52

Tabela 16 - Áreas sob a curva e intervalos de confiança das curvas ROC dos marcadores inflamatórios em secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite viral aguda, durante as primeiras 24h de internação (T1) e quinto dia de internação (T2) hospitalar, para predição de necessidade de ventilação mecânica..... 53

Tabela 17 - Áreas sob a curva e intervalos de confiança das curvas ROC dos marcadores inflamatórios no plasma de pacientes com bronquiolite viral aguda, durante as primeiras 24h de internação (T1) e quinto dia de internação (T2) hospitalar para predição da necessidade de ventilação mecânica. 55

Tabela 18 - Dados demográficos e fatores de risco..... 84

Lista de tabelas

Tabela 19 - Dados clínicos 85

Tabela 20 - Dados de terapia intensiva 88

Tabela 21 - Painel de ensaio de qPCR para cada vírus..... 108

Lista de abreviaturas e siglas

bpm	Batimentos por minuto
CCL-2	Chemokine ligand 2 (ligante 2 da quimiocina) ou MCP-1
CD8	Grupamento de Diferenciação 8
CID	Código Internacional das Doenças
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxynucleotide Solution Mix
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FLU	Vírus influenza
GC	Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa);
H2O	Água
H2O2	Peróxido de hidrôgenio
HAD	Adenovírus Humano
HMPV	Metapneumovírus Humano
HRV	Rinovírus Humano
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (molécula de adesão intercelular 1)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina-17
IL-1RAcP	Proteína acessória do recpetor da IL-1
IL-2	Interleucina 2
IL-33	Interleucina 33
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6

Lista de abreviaturas e siglas

IL-8	Interleucina 8
irm	Incursões respiratórias por minuto
Kg	Quilograma
µL	Microlitro
mm	Milímetro
NF-kB	Fator nuclear kB
NK	Natural Killer
NOD	Domínio de oligomerização de nucleotídeo contendo proteína
O2	Oxigênio
OR	Odds Ratio
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pcg/ml	Picograma por mililitro
PRISM	Pediatric Risk of Mortality Score
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RPM	Rotações por minuto
ROC	Receiver Operating Characteristic
RR	Risco Relativo
RT-qPCR	PCR em tempo real e transcrição reversa
SF0,9	Soro Fisiológico a 0,9%
SIH/SUS	Sistema de Informação Hospitalar do SUS
ST2	Suppression of tumorigenicity 2
sST2	ST2 solúvel
ST2L	ST2 da membrana celular
T1	Tempo 1
T2	Tempo 2
Th1	Células T helper 1
Th17	Células T helper 17
Th2	Células T helper 2
TNF	Fator de necrose tumoral
UTI	Unidade de terapia Intensiva
UTIP	Unidade de terapia intensiva pediátrica
VM	Ventilação Mecânica
VNI	Ventilação mecânica não invasiva

Lista de abreviaturas e siglas

VSR	Vírus Sincicial Respiratório

Indice

1. Introdução 25
A Bronquiolite Viral Aguda 25
Mecanismos de resposta imune aos vírus respiratórios 28
O eixo Interleucina 33 e o receptor ST-2 32
2. Hipótese 35
3. Justificativa 36
4. Objetivos 37
Objetivo principal 37
Objetivos secundários 37
5. Casuística e Métodos 38
Participantes do estudo 38
Coleta de dados e processamento 38
Determinação dos marcadores inflamatórios 40
Análise estatística 41
6. Resultados 42
Características clínicas e demográficas 42
Detecção viral por imunofluorescência indireta e RT-qPCR 45
Concentrações dos marcadores inflamatórios 48
Construção de curvas ROC 53
7. Discussão 56
8. Conclusão 67
Referências Bibliográficas 68
Apêndices 79
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 80
APÊNDICE B – FICHA DE LEVANTAMENTO 84
APÊNDICE C – CURVAS ROC 89
Anexos 95
ANEXO A – Protocolo de processamento das amostras clínicas para realização de RT-qPCR 96

1. Introdução

A Bronquiolite Viral Aguda

O termo “bronquiolite” é utilizado para definir a inflamação mucosa das vias aéreas de calibres tipicamente menores que 2 mm de diâmetro (GARIBALDI; ILLEI; DANOFF, 2012). A doença foi inicialmente relatada em 1901 por Wilhelm Lange, que descreveu os achados de duas necropsias com alterações de brônquios e bronquíolos as quais, no ano seguinte, Fraenkel denominou “bronquiolite obliterante” (GARIBALDI; ILLEI; DANOFF, 2012; TESHOME; GATTU; BROWN, 2013). Mais tarde, Gardner (1968) sugeriu, pela primeira vez, definições clínicas para as doenças respiratórias de etiologia viral que acometem a infância. A bronquiolite viral foi definida como patologia que acomete lactentes e crianças jovens, em epidemias, e que se manifesta com sinais e sintomas de acometimento de vias aéreas inferiores, precedido por pródromo viral de “24 horas a alguns dias”. O quadro clínico compreende taquipneia, tosse frequente, forte e persistente, sibilos respiratórios, podendo acompanhar febre variável e estertoração à ausculta. A radiografia de tórax em geral confirma a hiperinsuflação pulmonar, e são frequentes achados consistentes com atelectasia.

Este conjunto de achados clínicos ainda constitui a única ferramenta para o diagnóstico da doença na atualidade, embora não haja, até o presente momento, critérios clínicos padronizados pela comunidade científica para definição de caso (FERNANDES et al., 2016). Tal dificuldade se deve ao fato de que suas manifestações se sobrepõem às de outras patologias respiratórias conhecidas, como asma e episódios isolados de sibilância (KUZIK, 2016; FERNANDES et al., 2016). Além disso, a bronquiolite pode ser secundária a outras causas, tanto autoimunes, quanto externas, como pós-infecciosas, inalação/ingestão de substâncias tóxicas, pós-transplantes, doenças do colágeno ou sem causa determinada (idiopática) (GARIBALDI; ILLEI; DANOFF, 2012; TESHOME; GATTU; BROWN, 2013).

Cerca de uma em cada 10 crianças com bronquiolite viral aguda necessitam de internação anualmente nos Estados Unidos (HASEGAWA et al., 2015) e, destas, 2 a 3 % necessitam de internação em UTI. Uma recente publicação canadense

descreveu que, de cada 1.000 crianças daquele país, 1,3 necessitaram de internação em decorrência de patologia respiratória provocada pelo vírus sincicial respiratório (VSR) no período avaliado (MITCHELL; DEFOY; GRUBB, 2017). Reeves et al. (2017) relataram aproximadamente 28.000 internações hospitalares por ano atribuídas à bronquiolite viral aguda, na Inglaterra, perfazendo 22,9% do total de internações em menores de 5 anos. No Brasil, de acordo com o DATASUS - Sistema de Informações Hospitalares (SIH/SUS, 2017) houve 52.275 internações sob o CID "bronquite aguda e bronquiolite aguda" em menores de 5 anos em 2017, representando 14,9% das 349.720 admissões por doenças do aparelho respiratório neste mesmo ano e 4,7 de cada 1.000 internações nesta faixa etária. Gastos com as admissões hospitalares por bronquiolite viral aguda chegam a US$ 1,73 bilhões anuais nos Estados Unidos (RALSTON et al., 2014). O gasto geral com a doença no Brasil em 2017 foi de R$ 24.694.400,39 e, em serviços hospitalares, R$21.458.743,08 (DATASUS - SISTEMA DE INFORMAÇÕES HOSPITALARES (SIH/SUS), 2017).

Em revisão sistemática de 329 trabalhos sobre o assunto, estimou-se que, em 2015, aproximadamente 33 milhões de episódios de infecções de vias aéreas inferiores em menores de 5 anos relacionadas ao VSR resultaram em mais de 3 milhões de internações hospitalares em todo o mundo, sendo 90% delas em países de baixa e média renda. Os autores relataram que o VSR foi responsável por 118.000 óbitos, sendo 99% destes em países menos desenvolvidos (SHI et al., 2017).

Acredita-se que o VSR seja responsável por 50-80% dos casos de bronquiolite viral aguda (MEISSNER, 2016). Trata-se de vírus envelopado, não segmentado, de fita simples de polaridade negativa, que faz parte da família dos *Paramixovírus*, sendo o homem a única fonte de infecção (MANSBACH et al., 2012; TESHOME; GATTU; BROWN, 2013). Após a infecção, hospedeiros adultos imunocompetentes podem eliminar o vírus por 3 a 8 dias, enquanto crianças e indivíduos imunossuprimidos podem eliminá-lo por até 4 semanas (MANSBACH et al., 2012; TESHOME; GATTU; BROWN, 2013). Em torno dos 2 anos de idade, 99% das crianças já tiveram contato com este agente etiológico (SHI et al., 2017; FLORIN; PLINT; ZORC, 2017).

Embora os dados variem de acordo com a região e faixa etária, o rinovírus (HRV), é o segundo agente etiológico mais comumente descrito (5-38%) (CEBEY-

LÓPEZ et al., 2015; MEISSNER, 2016; FLORIN; PLINT; ZORC, 2017), seguido de outros, como influenza, adenovírus e parainfluenza (CEBEY-LÓPEZ et al., 2015). Na última década, novos vírus respiratórios foram detectados e associados às infecções de vias aéreas inferiores, como o metapneumovírus, alguns subtipos de coronavírus (GAGLIARDI et al., 2013; CEBEY-LÓPEZ et al., 2015) e o bocavírus (GAGLIARDI et al., 2009; GAGLIARDI et al., 2013; CEBEY-LÓPEZ et al., 2015; LIM et al., 2016).

A proporção de hospitalizações atribuíveis a cada um dos agentes causais é variável entre as diversas publicações e localizações geográficas (SHI et al., 2015; CEBEY-LÓPEZ et al., 2015; MEISSNER, 2016). Revisão sistemática e meta-análise conduzida por Shi et al. (2015) atribuiu associação de causalidade entre infecções de vias aéreas inferiores e VSR (OR 9.59– 9.79), influenza (OR 5.10–5.54), parainfluenza (OR 3.37–4.07) e metapneumovírus (OR 3.76–3.84). O rinovírus apresentou uma associação menos intensa com a doença (OR 1.43) e o adenovírus, bocavírus e coronavírus não apresentaram correlação estatística.

A prevalência de coinfecções virais varia de 1 a 40% e há controvérsia em relação à sua associação com a gravidade da doença (GAGLIARDI et al., 2009; MARGUET et al., 2009; GAGLIARDI et al., 2013; CEBEY-LÓPEZ et al., 2015; LIM et al., 2016). Revisão sistemática e meta-análise recente não encontrou associação de coinfecção viral com necessidade de hospitalização ou internação em UTI (LIM et al., 2016).

A despeito de baixa mortalidade causada diretamente pela bronquiolite viral aguda (0,1-0,5%) (FLORES-GONZÁLEZ et al., 2017; DATASUS - SISTEMA DE INFORMAÇÕES HOSPITALARES (SIH/SUS), 2017) e de seu caráter sazonal, com predomínio nos meses de outono e inverno (SWINGLER; HUSSEY; ZWARENSTEIN, 2000; CINTRA et al., 2001; GAGLIARDI et al., 2009; NAIR et al., 2010; PIEDRA, 2012; HALL et al., 2013; SILVA et al., 2013; KHOLY et al., 2013; GAGLIARDI et al., 2013; REEVES et al., 2017; WOLLMEISTER et al., 2018), a bronquiolite viral aguda se tornou, nos últimos 30 anos, não só a maior causa de internação hospitalar em crianças abaixo de 2 anos de idade em todo o mundo (KUZIK, 2016), como diagnóstico mais frequentemente realizado em lactentes no dia-a-dia do pediatra (NAIR et al., 2010; GARIBALDI; ILLEI; DANOFF, 2012; HALL et al., 2013; LEGAND et al., 2013; SHI et al., 2015; STEEN et al., 2016; BONT et al., 2016; GEOGHEGAN et al., 2017; SCHELTEMA et al., 2017; REEVES et al., 2017; SHEIN et al., 2017). Os vírus respiratórios estão implicados diretamente, em

sinergismo, ou como coinfecções com agentes bacterianos em até dois terços dos episódios de pneumonia, o que equivaleu a 800 milhões de casos estimados no mundo em 2010 (SHI et al., 2015; CABALLERO; POLACK, 2018). A Organização Mundial de Saúde e demais centros de pesquisa têm se organizado, principalmente nos últimos 15 anos, para identificar lacunas de conhecimento a respeito do ônus da doença em caráter global (NAIR et al., 2010; IWANE; FARNON; GERBER, 2013; LEGAND et al., 2013; SHI et al., 2015; SIMOES et al., 2015; SHI et al., 2017; SCHELTEMA et al., 2017). O objetivo final tem sido reunir evidências, em múltiplas frentes de pesquisa, para se estabelecerem intervenções específicas no combate aos vírus sincicial respiratório, as quais continuam inexistentes até o presente momento (NAIR et al., 2010; IWANE; FARNON; GERBER, 2013; LEGAND et al., 2013; SHI et al., 2015; SIMOES et al., 2015; SHI et al., 2017; SCHELTEMA et al., 2017).

Embora aproximadamente 3/4 dos pacientes acometidos e dos óbitos relacionados a bronquiolite viral aguda sejam representados por crianças previamente hígidas (HALL et al., 2009; GEOGHEGAN et al., 2017; FLORES-GONZÁLEZ et al., 2017), lactentes jovens, prematuros, comorbidades como broncodisplasia, cardiopatias e imunossupressão representam grupos de risco para a má evolução da doença (HALL et al., 2009; GEOGHEGAN et al., 2017; FLORES-GONZÁLEZ et al., 2017).

Mecanismos de resposta imune aos vírus respiratórios

A infecção do trato respiratório é adquirida pela inoculação da mucosa nasal ou conjuntival por secreção ou inalação de gotículas contendo os vírus. O período de incubação é de 4 a 6 dias. Congestão nasal e rinorreia são causadas pela replicação viral, com febre baixa ocorrendo em cerca de 50% dos lactentes (MEISSNER, 2016).

Dependendo do tipo do vírus, de sua carga viral e da competência imune do hospedeiro, a doença pode se restringir ao epitélio das vias aéreas superiores, ou atingir as vias aéreas inferiores (bronquiolite) e interstício alveolar (pneumonia), através da aspiração e deslocamento das células infectadas (TESHOME; GATTU; BROWN, 2013; RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). Resposta pobre, lenta ou inadequada, resulta em atraso no *clearance* do vírus, o que pode provocar uma evolução mais grave da doença (SUN; LÓPEZ, 2017). A idade da criança parece

inversamente correlacionada à intensidade da resposta inflamatória observada, acometendo, de forma desfavorável, prematuros e lactentes jovens (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

Edema, acúmulo de muco e células epiteliais necróticas ocasionados pela infecção viral levam a graus variáveis de obstrução dos bronquíolos (TESHOME; GATTU; BROWN, 2013; MORENO-SOLÍS et al., 2015; MEISSNER, 2016; FLORIN; PLINT; ZORC, 2017). Os bronquíolos se diferenciam dos brônquios por não possuírem cartilagem, característica que contribui para o aumento da resistência ao fluxo expiratório de ar durante a infecção (TESHOME; GATTU; BROWN, 2013).

O VSR se liga ao glicocálice da célula epitelial através de duas glicoproteínas de superfície, G e F. Esta última sofre mudança em sua conformação, que facilita a fusão do envelope viral com a membrana celular, permitindo a entrada da ribonucleoproteína viral no citosol (MEISSNER, 2016; SUN; LÓPEZ, 2017). O rinovírus se liga, na maior parte das vezes, ao receptor ICAM-1. Já o vírus influenza se conecta aos resíduos de ácido siálico. A seguir, ocorre a endocitose desses vírus e, uma vez dentro do ambiente intracelular, procedem ao processo de replicação (FUENTE; MACDONALD; HERMOSO, 2015).

Em resposta, o organismo hospedeiro tenta inibir a multiplicação viral e eliminar os vírus, através de mecanismos que são tanto protetores quanto patogênicos (VANDINI et al., 2017).

Enquanto a degradação de glicoproteínas F, G e SH malformadas dos vírus e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio no ambiente intracelular inibem a multiplicação das células infectadas, a indução da atividade das caspases 2, 3, 8 e 9 promove sua apoptose, resultando em necrose das células epiteliais respiratórias (SUN; LÓPEZ, 2017).

A resposta imune inata, que se inicia através dos receptores de reconhecimento de padrão do epitélio respiratório e de macrófagos alveolares infectados (receptores de domínio de oligomerização de nucleotídeos, –NOD–, e receptores do tipo Toll 2, 3, 4 e 7), suscita uma suprarregulação de citocinas e quimiocinas (dentre elas, interferons (IFNs) tipo I, interleucina (IL)-6, interleucina (IL)-8, fator de necrose tumoral (TNF)-α e interleucina (IL)-1β), resultando em uma infiltração celular maciça de neutrófilos, monócitos, eosinófilos, células *Natural Killer* (NK) e linfócitos T (SUN; LÓPEZ, 2017; VANDINI et al., 2017).

Células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígeno

relacionadas ao VSR e também estão envolvidas na secreção de IFNs e demais citocinas (IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-10 e IL-13), de forma a regular e ativar o sistema imune inato (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). Uma resposta TNF-α e IL-6 robustas, durante a fase inicial da infecção, parecem limitar a doença às vias aéreas superiores (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

O IFN tipo I representa a principal interleucina capaz de exercer as funções acima descritas, limitando a replicação viral e modulando a resposta imune Th1 (SUN; LÓPEZ, 2017; RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017; VANDINI et al., 2017). Uma resposta limitada desta citocina e de células dendríticas foi observada em camundongos infectados pelo VSR no período neonatal, demonstrando uma imaturidade do sistema imune neste período (VANDINI et al., 2017).

A IL-8 é a quimiocina responsável por promover um influxo maciço de neutrófilos para as vias aéreas, (SUN; LÓPEZ, 2017; RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017; VANDINI et al., 2017) principais responsáveis pela destruição e descamação do epitélio respiratório (VANDINI et al., 2017). Após sua migração e ativação, os neutrófilos atingem seu pico de concentração, coincidindo com o momento de maior carga viral e gravidade clínica (tosse, sibilância e taquipneia, que ocorrem entre os dias 4 e 5 da doença), caracterizado por intensa apoptose celular e formação de redes extracelulares de neutrófilos (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). A lesão neutrófilo-induzida durante o período de desenvolvimento pulmonar na infância parece produzir consequências graves, com danos à arquitetura pulmonar e desenvolvimento posterior de episódios de sibilância de repetição e asma em crianças susceptíveis (SUN; LÓPEZ, 2017; RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017; VANDINI et al., 2017). Seu predomínio, acompanhado por uma escassez de células *Natural Killer*, foram demonstrados em tecidos pulmonares de casos fatais de bronquiolite viral aguda (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

Na transição da fase aguda para a convalescença da infecção primária, a IFN I também é responsável pela ativação da resposta antiviral de células B (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). A produção de anticorpos, principalmente IgG, tem como alvo as glicoproteínas F e G virais (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). Aumento da IgE ocorre em resposta a estas mesmas glicoproteínas, porém sua presença na bronquiolite viral aguda parece ser deletéria. Já o desenvolvimento da resposta IgA, a qual é aparentemente deficiente em lactentes e crianças, demonstrou exercer papel fundamental na recuperação da doença e na geração de células B de memória

(RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

A reação pró-inflamatória mediada por células T necessária para o controle dos patógenos intracelulares, resposta Th1, se inicia por meio da indução da produção do IFN-γ pela IL-12. O IFN-γ representa, portanto, a principal interleucina na resposta antiviral célular, tanto sistêmica, quanto local (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). Outras interleucinas envolvidas nestas vias são as IL-1, IL-2, IL-18 e o TNF-α (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

A resposta Th2 é caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, gerando eosinofilia e produção de anticorpos (particularmente IgE) (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). Embora ela esteja associada à proteção contra infecções parasitárias, foi constatada uma predominância desta, conjuntamente com um perfil de citocinas e células Th17, em detrimento da resposta Th1, em lactentes com infecção viral respiratória pelo VSR. Este padrão alterado de reação inflamatória parece provocar alterações graves na função das células brônquicas, de forma semelhante à encontrada na doença asmática (WALZL et al., 2001; BERMEJO-MARTIN et al., 2007; LAMBERT et al., 2014; ESPINOZA et al., 2014; ARRUVITO; RAIDEN; GEFFNER, 2015; CARRASCO et al., 2015; BOHMWALD et al., 2016; RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). Embora os achados ainda não sejam completamente consistentes na literatura, a IL-25, a IL-33 e a linfopoetina estromal tímica têm sido apontadas como possíveis responsáveis por esta polarização Th2 da resposta imune celular, possivelmente correlacionada a uma pior evolução na fase aguda da doença e, também, à infiltração neutrofílica, aparentemente responsável pela ocorrência de episódios de broncoespasmos de repetição e asma (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

Os vírus, principalmente o sincicial respiratório, em contrapartida, são capazes de infrarregular as respostas imunes antivirais (SUN; LÓPEZ, 2017). Proteínas do VSR são capazes inibir as vias de sinalização do IFN, limitar a ação das caspases, embora, por outro lado, através de apoptose celular, promovam linfopenia durante o início da fase aguda da doença. Além disso, possuem ação inibitória sob a ativação e diferenciação de células T CD8+ em células de memória (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). Tais mecanismos parecem não ocorrer com a mesma intensidade nas bronquiolites virais agudas por outros vírus, como o rinovírus e o metapneumovírus (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

O eixo Interleucina 33 e o receptor ST-2

A IL-33 foi originalmente descrita como proteína nuclear de vasos especializados que medeiam a entrada de linfócitos nos linfonodos e outros órgãos linfoides, como amígdalas e placas de Peyer (CAYROL; GIRARD, 2018). Foi identificada por Schmitz et al. (2005) como o ligante do receptor ST2 (também denominado IL1RL1) que, devido a este receptor e à sua estrutura molecular, sugeriu seu nome e sua inclusão na família das IL-1. A família das IL-1 é constituída de 11 citocinas e 10 receptores, sendo responsável pela imunidade inata endógena e exógena do hospedeiro, além de também ser capaz de modular o sistema imune adaptativo (DINARELLO, 2018).

De acordo com a revisão de Cayrol e Girard (2018), o gene da IL-33 está localizado no braço curto do cromossomo 9. O gene contém tanto um sítio que pode ser ativado pelo IFN, quanto vários sítios de ativação de IFN-γ.

A proteína completa resultante da transcrição e translação possui: um domínio central, que é o local de clivagem de serino-proteases inflamatórias, resultando na ativação da IL- 33; um domínio terminal-C, semelhante a das demais representantes da família das IL-1, local de clivagem de caspases; e domínio terminal-N, que caracteriza sua proforma intranuclear (proIL-33 ou IL-33$_{FL}$) (CARRASCO et al., 2015; CAYROL; GIRARD, 2018). A deleção do domínio N resulta em um processo inflamatório letal, demonstrando que esta forma intranuclear é essencial para exercer sua função *in vivo* (CARRASCO et al., 2015). Muitos polimorfismos de seu gene foram associados à presença de asma e mutações que produzem uma IL-33 defeituosa demonstraram redução de eosinofilia e proteção contra a doença asmática. Sua clivagem resulta em diversas formas bioativas desta proteína (CARRASCO et al., 2015; CAYROL; GIRARD, 2018).

Na ausência de estímulo pró-inflamatório, a IL-33 tem localização intranuclear (CAYROL; GIRARD, 2018). Embora sugeriu-se que a IL-33$_{FL,}$ teria ação reguladora da transcrição, sua função permanece a esclarecer (CAYROL; GIRARD, 2018). O que se sabe até agora é que esta localização é responsável pela sua autorregulação e que ela é capaz de se ligar à cromatina e às histonas intranucleares (CAYROL; GIRARD, 2018). No compartimento extracelular, comprovou-se que ela age tanto como citocina, quanto como fator regulador da expressão proteica em células endoteliais (CAYROL; GIRARD, 2018).

A IL-33 não possui apenas uma única via específica para sua estimulação, tendo sido descritas, até o momento, 6 serino-proteases distintas capazes de clivar sua forma intranuclear, resultando em sua ativação: a catepsina G, a elastase e a proteinase 3 de neutrófilos e a quimase, triptase e granzima B de mastócitos (CAYROL; GIRARD, 2018).

Dano ou necrose celular e tecidual são fatores críticos na indução da liberação da IL-33 (LE et al., 2013; CAYROL; GIRARD, 2018), desempenhando papel fundamental para o *clearance* bacteriano e fúngico (ALVES-FILHO et al., 2010; LE et al., 2013). Em modelos animais, as infecções pelo vírus influenza, rinovírus e VSR também foram capazes de provocar a liberação desta citocina por células do epitélio respiratório (GOFFIC et al., 2011; LIU et al., 2015; HAN et al., 2017; CAYROL; GIRARD, 2018). Demonstrou-se que sua liberação em resposta ao estresse pode ocorrer em apenas 10 minutos, com picos de concentração entre 15 minutos e 1 hora. Por tal rapidez e devido a seu potencial pleiotrópico, a IL-33 tem recebido a denominação de “alarmina” (LE et al., 2013; CAYROL; GIRARD, 2018).

O receptor da IL-33, ST2, é membro da família dos receptores IL-1 e existe em duas formas principais: a ST2L, proteína transmembrana, e sua forma solúvel, a sST2 (MUELLER; JAFFE, 2015).

Classicamente, a ativação da ST2L resulta na ativação da resposta Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (CARRASCO et al., 2015). No entanto, diferentes modulações da expressão da ST2 em células imunes, em diferentes condições, explicam o papel pleiotrópico atribuído à IL-33, que é capaz de polarizar células T virgens, levando-as a produzir citocinas associadas tanto a resposta inflamatória do tipo Th1, quanto Th2, T regulatórias e Th17 (CAYROL; GIRARD, 2018).

Portanto, além de funções na modulação do processo inflamatório, o eixo IL-33/ST2 também atua no reparo tecidual e na recuperação de lesões teciduais, embora por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (KRYCHTIUK et al., 2017). Ações deletérias deste eixo vêm sendo descritas relacionadas à processos autoimunes (artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e doenças alérgicas) e, ações protetoras, à doenças metabólicas que cursam com exacerbação da resposta Th1, como a ateroesclerose (ROSTAN et al., 2015). No modelo proposto de desequilíbrio da resposta da imunidade adaptativa levando a formas mais graves da bronquiolite viral aguda em lactentes, alguns autores questionam se a resposta Th2 possa ocorrer com o intuito de limitar uma resposta inflamatória Th1 ainda mais

prejudicial (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

As células que expressam o ST2L são os principais alvos da IL-33, são elas: mastócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos, células linfóides inatas tipo 2, células NK, T NK, Th1, Th2, T regulatórias e TCD8. A ligação da IL-33 a seu receptor de membrana permite que este interaja com o IL-1RAcP (receptor acessório), induzindo a sinalização intracelular, o que resulta na translocação nuclear do NFκB e na transcrição de genes pró-inflamatórios (ROSTAN et al., 2015; CAYROL; GIRARD, 2018).

Em sua função de alarmina, as principais células-alvo da IL-33 são as células dendríticas, levando-as a produzirem IL-6 (CARRASCO et al., 2015). Células NK e células T NK são induzidas pela IL-33, de forma dependente da IL-12 (resposta Th1), a secretarem IFN-γ (LE et al., 2013). Em mastócitos, a IL-33 pode estimular a liberação das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, histamina, protaglandinas, triptases, fator de crescimento do endotélio vascular, IL-2, IL-6, IL-9, TNF, CCL2, IL-8 e IL-17 (THEOHARIDES et al., 2015). Em eosinófilos, as IL-33 induzem sua degranulação, produção de espécies reativas de oxigênio e secreção de IL-5, também promovendo o perfil de resposta imune Th2 (FUENTE; MACDONALD; HERMOSO, 2015).

A atividade da IL-33 é regulada através de quatro mecanismos (CAYROL; GIRARD, 2018): 1) sequestro nuclear, com o objetivo de evitar atividade inadequada de citocinas pró-inflamatórias e reestabelecer a homeostase; 2) atividade das caspases 1, 3 e 7 durante a apoptose celular; 3) oxidação em resíduos de cisteína; acredita-se que, considerando a rapidez com que esta inativação ocorre *in vitro*, este mecanismo seja uma das principais formas de inativação desta proteína; 4) ST2 solúvel (sST2), o qual funciona como receptor “chamariz” para a IL-33, ligando-se a esta proteína e, dessa forma, inativando-a (MUELLER; JAFFE, 2015). Por exercer esta função, o sST2 vem sendo correlacionado com gravidade em doenças autoimunes, asma, fibrose pulmonar idiopática, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca.

2. Hipótese

Um aumento na produção da interleucina-33 e de seu receptor sST2 está associado à maior gravidade da bronquiolite viral aguda em crianças, representada pela necessidade de ventilação mecânica.

3. Justificativa

O tratamento da bronquiolite viral aguda ainda é limitado a sintomáticos e tratamento de suporte, com suplementação de oxigênio, quando indicada, e manutenção da permeabilidade das vias aéreas, ficando o clínico sem outros instrumentos que realmente tratem a causa de base. A identificação de pacientes que possam evoluir de forma desfavorável e a melhor compreensão da fisiopatologia das formas graves da doença podem auxiliar na adoção de novas estratégias de prevenção e identificar potenciais alvos terapêuticos.

A modulação do eixo IL-33/ST2 nas doenças respiratórias virais tem sido demonstrada nos últimos anos em modelos murinos (ZENG et al., 2015; LIU et al., 2015; SARAVIA et al., 2015; QI et al., 2015; STIER et al., 2016). Sua função *in vivo* na regulação da resposta inflamatória na bronquiolite viral aguda, contudo, permanece pouco elucidada, com resultados controversos entre as publicações (SARAVIA et al., 2015; CHRISTIAANSEN et al., 2016; GARCÍA-GARCÍA et al., 2017). Quanto ao sST2, apesar de representar um promissor marcador de gravidade em diversas situações, possui única publicação, *in vivo*, demonstrando sua associação com maior gravidade na bronquiolite viral aguda pelo VSR (FABER et al., 2012). Portanto, este trabalho teve o objetivo de verificar se as concentrações da IL-33 e do sST2 em secreção respiratória e plasma de crianças acometidas por infecções de vias aéreas inferiores de etiologia viral poderiam ser utilizadas como marcadores de gravidade na bronquiolite viral aguda.

4. Objetivos

Objetivo principal

Avaliar as concentrações da interleucina-33 e do receptor sST2 em secreção de nasofaringe e plasma e sua associação com a gravidade da bronquiolite viral aguda.

Objetivos secundários

Caracterizar clínica e epidemiologicamente as crianças internadas por bronquiolite viral aguda no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Verificar associações entre os marcadores da resposta inflamatória interleucina – 1ß, interleucina – 4, interleucina – 6, interleucina – 8 e Fator de Necrose Tumoral – α em secreção nasofaríngea e plasma e a gravidade da doença.

5. Casuística e Métodos

Participantes do estudo

Foi realizado estudo prospectivo observacional no período de dois anos. Foram consideradas elegíveis para o estudo todas as crianças menores de 5 anos com diagnóstico clínico de bronquiolite viral aguda e necessidade de internação na enfermaria de pediatria ou na UTIP da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Trata-se de hospital universitário de característica terciária, especializado no atendimento de urgências e emergências, que conta com 30 leitos de enfermaria de pediatria geral e 8 leitos médico-cirúrgicos de terapia intensiva pediátrica. Pacientes que fizeram uso de corticosteroide sistêmico por período superior a 24h no último mês e com diagnóstico de múltiplas comorbidades foram excluídos. Por múltiplas comorbidades entendem-se os pacientes com síndromes genéticas diagnosticadas previamente ao período do estudo, crianças com cardiopatias congênitas complexas e/ou crianças que possuíam acometimento de mais de dois órgãos e sistemas. Pacientes com Síndrome de Down foram incluídos. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da instituição (parecer nº 17470/2014).

Coleta de dados e processamento

Todos os pacientes foram identificados por processo de busca ativa nas unidades, de acordo com o protocolo de inclusão. Permissão para a inclusão dos pacientes na pesquisa foi solicitada aos familiares e responsáveis e obtida a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice A). Foi preenchida ficha de levantamento contendo dados epidemiológicos, clínicos, de terapia intensiva, exames complementares e manejo terapêutico (apêndice B), a partir de entrevista com familiares e revisão dos prontuários. Foi aplicado um escore de gravidade da bronquiolite viral aguda, que avaliou a gravidade dos pacientes durante a internação, conforme proposto por Walsh et al. (1997) e modificado por Gagliardi et al. (2013) (Tabela 1).

Tabela 1 - Escore de Gravidade Clínica durante a internação

Sintomas	**Escore**
Sintomas de trato respiratório superior	0
Sintomas de trato respiratório superior + sibilância	1
Hospitalização	1
Hospitalização maior que 5 dias	1
Uso de oxigênio suplementar	1
Uso de oxigênio suplementar maior que 5 dias	1
Necessidade de suporte ventilatório	2
Total	0-4=doença moderada 5-7=doença grave

Modificado de GAGLIARDI et al., 2013.

Os pacientes também foram avaliados pelo escore de gravidade clínica à admissão, baseado no esquema sugerido por Bamberger et al. (2012) (Tabela 2).

Tabela 2 - Escore de Gravidade Clínica à admissão

Escore	**1**	**2**	**3**
Sinais e sintomas respiratório	**Leve**	**Moderado**	**Grave**
Frequência respiratória (irm)			
0-12 meses	≤64	65-70	>70
13-24 meses	≤35	36-50	>50
Padrão respiratório	Ausente ou leve retração intercostal ou batimentos de aletas nasais	Retração intercostal moderada e retração de fúrcula. Gemência, batimento de aletas nasais	Retração intercostal grave, batimento de aletas nasais intenso e retração subcostal
Saturação de	>92%	90-92%	<90%
Secreção em via aérea	Rinorreia	Tosse frequente, engasgos, aumento da secreção	Inabilidade de mobilizar secreções

Modificado de BAMBERGER et al., 2012.

Em pacientes que necessitaram de terapia intensiva foi aplicado o escore de gravidade PRISM – Pediatric Risk of Mortality (POLLACK, 1988) entre 8 e 24 horas de internação na UTIP. Os escores de gravidade foram aplicados com o intuito de caracterizar a população estudada.

Aspirados nasofaríngeos foram obtidos nas primeiras 24 horas (± 12 horas) após a admissão hospitalar e no quinto dia de internação, por meio de sonda de

aspiração nasal, após instilação de 3 ml de soro fisiológico a 0,9% nas narinas, sendo então aspirada a secreção resultante diretamente por meio de uma seringa de 10 ml (CINTRA et al., 2001). Setecentos e cinquenta µL do total de cada amostra foram reservados para a identificação e quantificação dos seguintes vírus, utilizando a técnica de reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (RT-qPCR): vírus sincicial respiratório (VSR) A e B, influenza A (FLUA) e B (FLUB), rinovírus (HRV), metapneumovírus (HMPV) 1 e 2 e adenovírus (HAD). O protocolo do processamento das alíquotas se encontra detalhado no anexo A.1. A infecção viral por VSR, FLUA e FLUB também foi identificada por imunocromatografia (Alere Binax RSV Card, Abbott e Lumiratek influenza a+b, Lumiradx Healthcare), de acordo com indicação clínica do serviço.

Determinação dos marcadores inflamatórios

O restante do volume da secreção nasofaríngea foi centrifugado por 10 minutos a 3400 rpm e o sobrenadante, dividido em 4 alíquotas de, no mínimo, 250µl para dosagens das concentrações de IL-33, sST2, TNFα, IL-1β, IL-4, IL-6 e IL-8 utilizando-se kits comerciais por técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA; R&D systems). O mesmo processo foi realizado com uma segunda amostra, coletada no quinto dia de internação, ou antes, se o paciente tivesse critérios para alta hospitalar.

Amostras de sangue (5ml) foram obtidas em tubos heparinizados, centrifugadas por 10 minutos a 3400 rpm e o sobrenadante, dividido em 4 alíquotas de, no mínimo, 250µl, durante o primeiro ano de coletas (janeiro a dezembro de 2015), para avaliação das concentrações dos mesmos marcadores descritos acima. Este material também foi coletado nos 2 tempos da internação do paciente. Observou-se, ao longo do primeiro ano da pesquisa, uma grande perda no recrutamento de pacientes do grupo não submetido à ventilação mecânica, secundária ao não consentimento da coleta de sangue por parte dos responsáveis. Por este motivo, foi optado por se ater apenas às amostras de secreção nasofaríngea durante o ano seguinte.

Todo o material foi armazenado em – 70ºC dentro das primeiras 4 h da coleta, até a realização das dosagens.

Análise estatística

Para a análise estatística, a gravidade da bronquiolite viral aguda foi definida pela necessidade de ventilação mecânica. Crianças que necessitaram de ventilação mecânica invasiva ou não-invasiva formaram o grupo VM. Os pacientes que foram internados, mas que não receberam nenhum tipo de suporte ventilatório foram considerados como não graves, constituindo o grupo não-VM.

As variáveis contínuas foram expressas em mediana (variação) e as variáveis categóricas, em número (%). Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com a necessidade ou não de ventilação mecânica. A comparação entre os grupos foi feita através do teste U de Mann-Whitney para variáveis contínuas e teste exato de Fisher ou qui-quadrado para variáveis categóricas. O teste pareado de Wilcoxon foi utilizado para a comparação das variáveis contínuas nos dois tempos do estudo. Valores abaixo do limite de detecção[1] fornecido pelo fabricante para cada marcador inflamatório analisado foram substituídos por valores mínimos, subtraindo-se uma casa decimal do valor do limite de detecção.

Riscos relativos (RR) foram estimados por meio do ajuste de modelos de regressão log-binomial para verificar associações entre etiologias virais e necessidade de ventilação mecânica. Curvas Receiver Operating Characteristic (ROC) foram construídas para identificar pontos de corte nos valores dos marcadores inflamatórios para a discriminação da gravidade da doença, definida como necessidade de suporte ventilatório. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significante. A análise estatística foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism v. 7.0 (San Diego, CA) e o software SAS 9.4 (SAS institute, Cary, NC).

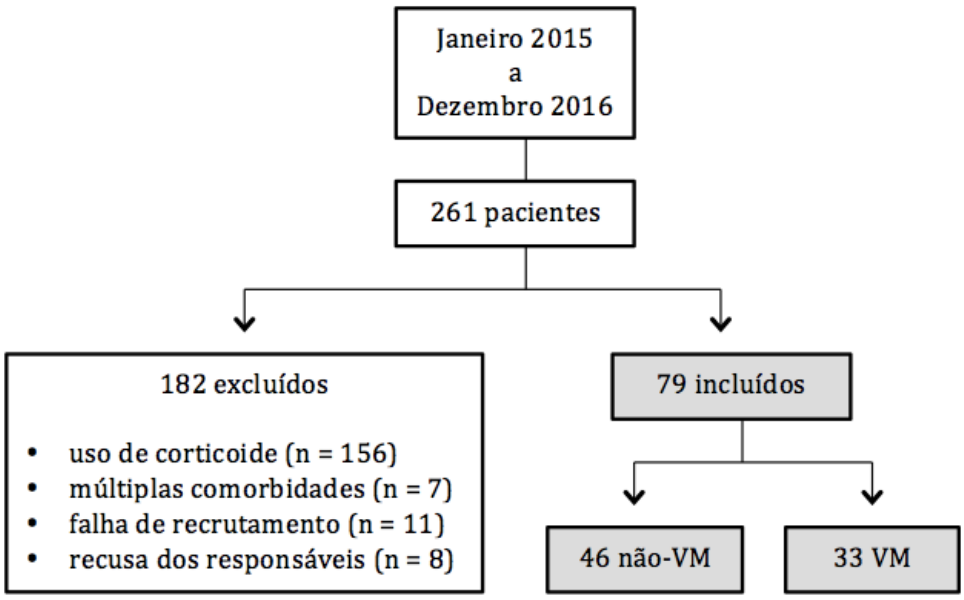
[1] Limites de detecção dos ensaios: IL-33 (0,187 pg/mL), sST2 (2,45 pg/mL), IL1ß (3,9 pg/mL), TNF-α (15,6 pg/mL), IL-4 (0,3 pg/mL), IL-6 (3,1 pg/mL) e IL-8 (31,2 pg/ml)

6. Resultados

Características clínicas e demográficas

De 1º de Janeiro de 2015 a 31 de Dezembro de 2016, 261 crianças de 0-5 anos de idade foram internadas na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com bronquiolite viral aguda. Destas, 79 foram incluídas no estudo. Trinta e três pacientes (41,7%) necessitaram de VM (grupo VM) e 46 (58,3%) não receberam suporte ventilatório (grupo não-VM). Dos 33 pacientes que necessitaram de suporte ventilatório, 7 permaneceram na enfermaria pediátrica por falta de leitos de UTI. Vinte e seis (32,9%) pacientes foram admitidos na UTIP e 53 (67,1%) na enfermaria. Durante todo o período, houve apenas um óbito (1,2%), por infecção de corrente sanguínea associada à cateter venoso central, não relacionado, portanto, à doença respiratória. Cento e oitenta e dois pacientes foram excluídos, pelos seguintes motivos: uso prévio de corticoide por mais de 24 horas (n=156), presença de múltiplas comorbidades (n=7), falha de recrutamento (n=11) e recusa dos responsáveis (n=8). A figura 1 mostra o fluxograma do estudo.

Figura 1 - Fluxograma de estudo



Das 79 crianças avaliadas, 43 (54,5%) eram do sexo masculino e 36 (45,5%), do sexo feminino. A mediana de peso foi de 4,5 kg (variação de 2,2-15,4 kg). A mediana da idade foi de 55 dias (variação de 10-1.235 dias), sendo 14 (17,7%) recém-nascidos, 69 (87,3%) menores de 6 meses, 76 (96,2%) menores de 1 ano e apenas um paciente (1,2%) acima dos 2 anos de idade (3 anos e 4 meses). Apenas 23 pacientes (29,1%) não possuíam fatores de risco ou comorbidades prévias. A prevalência de prematuridade foi de 25,3% e a mediana da idade gestacional dentre os prematuros foi de 34 semanas (variação de 28,2-36,6 semanas). Não houve significância estatística na comparação entre as idades gestacionais dos prematuros do grupo de pacientes submetidos à ventilação mecânica (mediana 32,1 semanas; variação de 28,2-36,3 semanas) e o grupo não submetido à ventilação (mediana 35 semanas; variação de 31,2-36,6 semanas; p=0,2). Dentre os pacientes internados no período e incluídos no estudo, apenas um havia recebido Palivizumab.

A mediana do tempo de duração dos sintomas previamente à admissão foi de 4 dias (variação 1-21 dias); 78,4% necessitaram de oxigenoterapia suplementar por tempo mediano de 6 dias (variação de 1-248 dias) A mediana da saturação periférica de O2 foi de 95,5% (variação de 38- 100%). A mediana da duração da internação hospitalar foi de 9 dias (variação de 2-248 dias). Apenas cinco pacientes (6,3%) não receberam ß-2 agonista inalatório, 68 (86%) fizeram exames complementares e 32 (40,5%) receberam algum tipo de tratamento antimicrobiano.

Quanto às características dos pacientes internados na UTIP, 16 (61,5%) eram do sexo masculino e 10 (38,5%), do sexo feminino. A mediana de idade em dias foi de 47 dias (variação de 13-311 dias). A mediana do peso foi de 4,35 kg (variação de 2,2-8 kg). A mediana do tempo de internação hospitalar foi de 15 dias (variação de 6-248 dias) e a mediana do tempo de internação na UTIP foi de 10 dias (variação de 3-111 dias). Os 14 pacientes submetidos à intubação orotraqueal representaram 53,8% do total de pacientes admitidos na unidade e 17,7% do total de pacientes incluídos. A mediana do tempo de ventilação mecânica invasiva foi de 8,5 dias (variação de 6-246 dias). A mediana do tempo de ventilação não-invasiva, através de ventilação por pressão positiva contínua ou intermitente com pronga nasal, foi de 4 dias (variação de 2-9 dias). Vinte e três pacientes (88,4%) foram tratados com antimicrobianos, 23 (88,4%) com ß2-agonistas na forma inalatória e 8 (30,7%) na forma IV duração mediana de 3 dias, variação de 1-7 dias). A mediana do PRISM foi

de 7 (variação de 1-15). As indicações de internação foram hipoxemia (n=12), desconforto respiratório (n= 10), bradipneia/apneia (n=2), hipercapnia (n=1) e sepse (n=1).

Dentre os 7 pacientes que necessitaram de ventilação não-invasiva e permaneceram internados em leito de enfermaria, a mediana do tempo de duração da internação foi de 11 dias (variação de 5-209 dias) e a mediana do tempo de duração da ventilação por pressão positiva contínua nas vias aéreas com pronga nasal foi de 2 dias (variação de 1-6 dias), sendo que todos os participantes receberam esta modalidade ventilatória durante o período.

A comparação entre os grupos submetidos a VM e que não necessitaram de VM é descrita na tabela 3.

Tabela 3 - Comparação dos pacientes incluídos no estudo, de acordo com a necessidade ou não de ventilação mecânica

Características	VM (n=33)	Não VM (n=46)	*p*
Características demográficas e clínicas			
Idade, dias	46 (11-1235)	62,5 (10-651)	0,67
Peso, kg	4,5 (2,2-15,4)	4,4 (2,8-11)	0,35
Sexo masculino	22 (66,6)	26 (56,5)	0,07
Escore de gravidade à admissão hospitalar*	8 (3-12)	4 (1-6)	**<0,0001**
Escore de gravidade clínica**	7 (3-7)	4 (1-6)	**<0,0001**
Saturação de O2 (%) à admissão	95 (38-100)	92 (80-98)	0,34
Duração dos sintomas antes da internação hospitalar, dias	3 (2-15)	5 (1-21)	0,05
Contactantes doentes	25 (75,7)	26 (56,5)	0,07
Frequência respiratória	55,5 (38-86)	56 (32-97)	0,93
Comorbidades§			0,35
Prematuridade	13 (39,3)	7 (15,2)	
Cardiopatia Congênita	1 (3,0)	0	
Imunossupressão	2 (6,0)	2 (4,3)	
Neuropatia	4 (12,1)	7 (15,2)	
Antecedentes§			0,29
Episódio prévio de sibilância	4 (12,1)	10 (21,7)	
Episódio prévio de VM	7 (21,2)	5 (10,8)	
História familiar de atopia	10 (30,3)	16 (34,7)	

Características	VM (n=33)	Não VM (n=46)	*p*
Manejo			
Uso de antimicrobiano	24 (72,7)	8 (17,3)	**<0,0001**
Uso de ß2-agonista inalatório	30 (90,9)	44 (95,6)	0,64
Achados em exames de imagem e laboratoriais			
Atelectasia à radiografia de tórax	19 (57,5)	5 (10,8)	**<0,0001**
Hemograma - leucometria global, mm3	8.500 (3.100-18.600)	10.400 (5.300-29.200)	**0,009**
Proteína C Reativa, mg/dL	2,11 (0,11-10,3)	0,66 (0,05-8,2)	0,14
Diagnóstico de pneumonia	23 (69,7)	8 (17,3)	**<0,0001**
Desfechos			
Tempo de oxigenoterapia, dias	11 (2-248)	3 (0-40)	**<0,0001**
Duração da internação hospitalar, dias	14 (5-248)	6 (2-41)	**<0,0001**

Os dados estão representados em medianas (variações) ou n (%). * Bamberger et al, 2012; ** Gagliardi et al, 2013. § Teste do qui-quadrado; p<0,05.

Observou-se, no grupo VM, valores mais elevados dos escores de gravidade clínica, mais diagnósticos de atelectasia e pneumonia, valores mais baixos de leucometria global, maior tempo de oxigenoterapia e duração prolongada da internação hospitalar.

Detecção viral por imunofluorescência indireta e RT-qPCR

Dos 79 pacientes incluídos, 31 (39,2%) pacientes apresentaram imunocromatografia positiva para VSR. Após realização da identificação viral por RT-qPCR em secreção nasofaríngea, foram detectados vírus em 72 pacientes (92,2%), sendo 60 (83,3%) deles positivos para o VSR (tabela 4). O segundo vírus mais detectado entre as amostras, como vírus único ou em coinfecção, foi o rinovírus, seguido do metapneumovírus, vírus influenza e adenovírus.

Após comparação entre os resultados de imunocromatografia e PCR, constataram-se três testes falso-positivos (9,68%) e 25 falso-negativos (47,1%) para o VSR, estimando-se uma sensibilidade de 52,8% (IC95% 0,3966-0,6562) e especificidade de 77,9% (IC95% 0,514-0,948).

Tabela 4 - Prevalência de detecções virais por reação de polimerase em cadeia em tempo real em amostras de secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite viral aguda (n=79)

Vírus detectados	Número de amostras	%
VSR	60	75,9
HRV	25	31,6
HMPV	13	16,5
FLU	5	6,3
HAD	4	5,1
Não detectados	7	8,9

Legenda: VSR, vírus sincicial respiratório; HRV, rinovírus humano; HMPV, metapneumovírus humano; FLU, vírus influenza; HAD, adenovírus humano.

Trinta e nove amostras (49,4% dos pacientes) apresentaram um único vírus isolado. A distribuição dos vírus detectados em amostras como agente isolado é representada na figura 2.

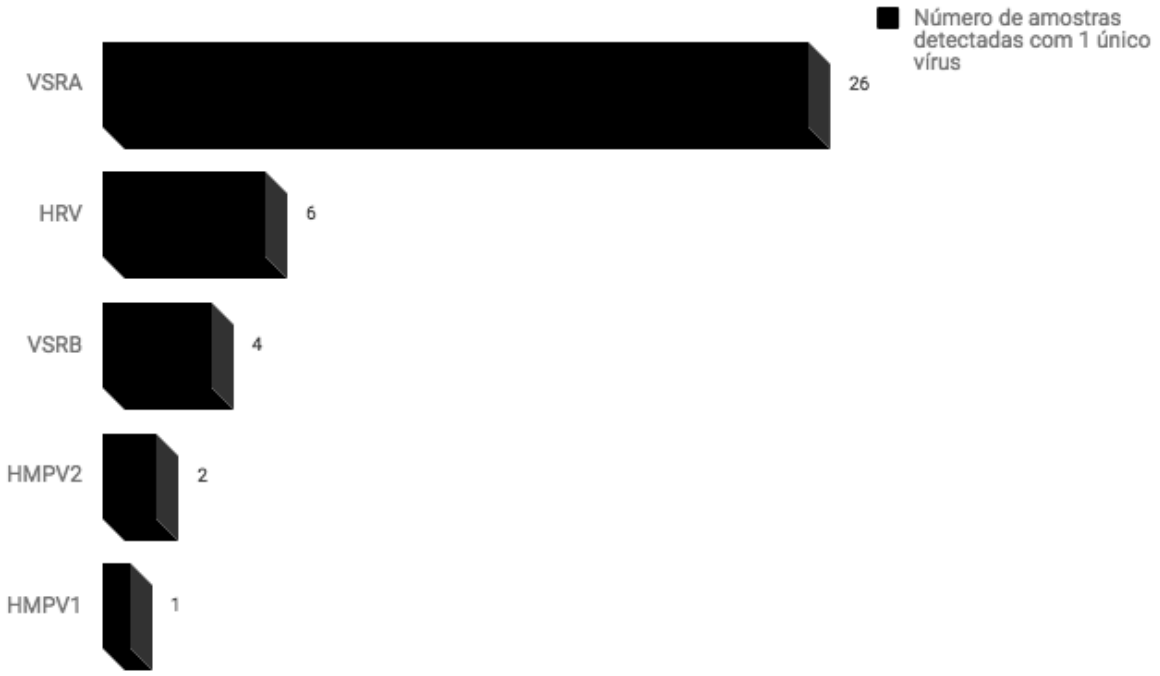


Figura 2 - Distribuição de vírus detectados isoladamente em secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite viral aguda pela técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real. VSR, vírus sincicial respiratório; HRV, rinovírus humano; HMPV, metapneumovírus humano; FLU, vírus influenza; HAD, adenovírus humano.

O VSR A foi o mais prevalente, tanto como agente único, quanto em co-detecções. Os vírus influenza e adenovírus foram detectados apenas em coinfecções, as quais foram encontradas em 33 pacientes (41,8%) (tabela 5).

Tabela 5 – Número de amostras de secreções respiratórias de pacientes com bronquiolite viral aguda com detecção de mais de um vírus por reação de polimerase em cadeia em tempo real

No de vírus detetados em co-infecções	**Vírus detectados**	**n (%)**
2 vírus	VSRA + HRV	10 (12,7)
n=22 (27,8%)	VSRA + VSRB	5 (6,3)
	VSRA + HMPV2	2 (2,5)
	VSRA + FLUA	1 (1,3)
	VSRB + HRV	1 (1,3)
	HRV + HMPV1	1 (1,3)
	HRV + HAD	1 (1,3)
	HMPV2 + FLUA	1 (1,3)
3 vírus	VSRA + VSRB + HMPV1	2 (2,5)
n=10 (12,7%)	VSRA + VSRB + HAD	1 (1,3)
	VSRA + HRV + FLUA	1 (1,3)
	VSRA + HRV + FLUB	1 (1,3)
	VSRA + HRV + HAD	2 (2,5)
	VSRA + HMPV1 + HMPV2	2 (2,5)
	VSRB + HRV + HMPV2	1 (1,3)
4 vírus	VSRA + HRV + HMPV2 + FLUA	1 (1,3)
n=1 (1,3%)		

Legenda: VSR, vírus sincicial respiratório; HRV, rinovírus humano; HMPV, metapneumovírus humano; FLU, vírus influenza; HAD, adenovírus humano.

A comparação entre os grupos de acordo com as etiologias virais é mostrada na tabela 6.

Tabela 6 – Prevalência dos vírus identificados por reação de polimerase em cadeia em tempo real nos grupos ventilação mecânica (VM) e não VM e sua associação com a gravidade da doença, expressa por riscos relativos e intervalos de confiança

Vírus	**VM (n=33)**	**Não VM (n=46)**	**RR (IC95%)**
VSR A	27 (50,0)	27 (50,0)	2,08 (0,98-4,39)
VSR B	5 (35,7)	9 (62,3)	0,82 (0,39-1,77)
HRV	8 (32,0)	17 (68,0)	0,69 (0,36-1,31)
HMPV 1	2 (33,3)	4 (66,7)	0,78 (0,25-2,51)
HMPV 2	6 (66,7)	3 (33,3)	1,72 (0,79-2,99)
FLU A	3 (75,0)	1 (25,0)	1,87 (0,99-3,52)
FLU B	1 (100)	0	
HAD	2 (50,0)	2 (50,0)	1,21 (0,44-3,34)

Os dados estão representados em n (%); legenda: VSR, vírus sincicial respiratório; HRV, rinovírus humano; HMPV, metapneumovírus humano; FLU, vírus influenza; HAD, adenovírus humano

Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos tipos de vírus entre os 2 grupos. Além disso, não houve associação de co-infecção viral com

a gravidade da doença (tabela 7).

Tabela 7 – Comparação entre os grupos ventilação mecânica (VM) e não VM quanto à infecção por vírus único e co-infecção com 2 ou mais vírus

Número de vírus	**VM (n=33)**	**Não VM (n=46)**	**RR (IC95%)**
1 vírus	15 (38,5)	24 (61,5)	1,35 (0,39-4,62)
2 vírus	10 (45,5)	12 (54,5)	1,59 (0,45-5,59)
3 ou 4 vírus	6 (54,5)	5 (45,5)	1,91 (0,53-6,93)

Os dados estão representados em n (%)

Concentrações dos marcadores inflamatórios

Com o objetivo de avaliar a associação dos marcadores inflamatórios com a gravidade da bronquiolite viral aguda, foram medidas, além da IL-33 e do receptor sST2, as concentrações de interleucinas e quimiocinas típicas da resposta imune inata, Th1 (IL-1ß, TNF-α, IL-6 e IL-8) e Th2 (IL4), em secreção nasofaríngea (tabela 8 e 10) e no plasma (tabela 9 e 11), durante os dois tempos de coletas do estudo. Os valores nas primeiras 24 horas estão representados nas tabelas 8 e 9 e, os do quinto dia de internação hospitalar, nas tabelas 10 e 11.

Tabela 8 - Concentração de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 em aspirado nasofaríngeo de crianças internadas por bronquiolite viral aguda, nas primeiras 24h de internação (T1), de acordo com presença (VM) ou ausência de ventilação mecânica (não VM)

	T1				
	VM (n=32)		**Não VM (n=45)**		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	***p***
IL-33	32	0,186 (0,186-4.096)	45	0,186 (0,186-111.423)	0,24
ST-2	32	5,63 (2,44-50.643)	44	2,44 (2,44-168,9)	0,26
IL-1ß	30	66,7 (3,8-3.099)	44	154,8 (3,8-1.949)	0,60
TNFα	30	15,5 (15,5-391,8)	43	15,5 (15,5-2.728)	0,86
IL-4	30	0,2 (0,2-13,5)	43	0,2 (0,2-54.603)	0,63
IL-6	32	235,5 (3-2.162)	44	86,0 (3-5.439)	0,12
IL-8	32	342,9 (31,1-2.553)	44	300,2 (31,1-4.493)	0,87

Os dados estão representados em medianas (variações)

Tabela 9 - Concentração de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 no plasma de crianças internadas por bronquiolite viral aguda, nas primeiras 24h de internação (T1), de acordo com presença (VM) ou ausência de ventilação mecânica (não VM)

	T1				
	VM (n=17)		**Não VM (n=19)**		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	***p***
IL-33	17	0,186 (0,186-1.638)	19	0,186 (0,186-840,4)	0,29
ST-2	17	2,44 (2,44-140,8)	19	13,0 (2,44-705,9)	0,24
IL-1ß	17	66,7 (3,8-136,4)	18	154,8 (3,8-226)	0,15
TNFα	17	15,5 (15,5-15,5)	18	15,5 (15,5-665,6)	0,99
IL-4	17	0,2 (0,2-6.852)	18	0,2 (0,2-75,3)	0,53
IL-6	17	3 (3-769,6)	19	3,2 (3-177,5)	0,27
IL-8	17	104,5 (31,1-4.112)	19	108,3 (31,1-4.219)	0,74

Os dados estão representados em medianas (variações)

Tabela 10 - Concentração de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 em aspirado nasofaríngeo de crianças internadas por bronquiolite viral aguda, no quinto dia de internação (T2), de acordo com presença (VM) ou ausência de ventilação mecânica (não VM)

	T2				
	VM (n=31)		**Não VM (n=38)**		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	***p***
IL-33	31	0,186 (0,186-83,67)	38	0,186 (0,186-793,3)	0,21
ST-2	31	2,44 (2,44-1.105)	38	2,44 (2,44-853,6)	0,19
IL-1ß	31	182,1 (3,8-1.335)	37	45,1 (3,8-2.195)	0,53
TNFα	31	15,5 (15,5-158,6)	36	15,5 (15,5-640,5)	0,27
IL-4	31	6,9 (5,3-12,2)	35	5,3 (5,3-11,1)	0,60
IL-6	**31**	**152,6 (3-1.885)**	**38**	**14,4 (3-1.287)**	**0,001**
IL-8	**31**	**1.113 (31,1-4.313)**	**38**	**792,2 (31,1-4.505)**	**0,03**

Os dados estão representados em medianas (variações)

Tabela 11 - Concentração de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 no plasma de crianças internadas por bronquiolite viral aguda, no quinto dia de internação (T2), de acordo com presença (VM) ou ausência de ventilação mecânica (não VM)

	T2				
	VM (n=17)		**Não VM (n=16)**		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	**p**
IL-33	17	0,78 (0,186-2.486)	16	36,2 (0,186-88.744¥)	0,37
ST-2	17	2,44 (2,44-1708)	16	2,44 (2,44-1159)	0,28
IL-1ß	17	3,8 (3,8-1749)	16	3,8 (3,8-847,8)	0,62
TNFα	17	15,5 (15,5-77,2)	16	15,5 (15,5-2.177)	0,74
IL-4	17	4,34 (0,2-14,3)	16	2,75 (0,2-85.900¥)	0,60

	T2				
	VM (n=17)		Não VM (n=16)		
	n	Valor (pg/ml)	n	Valor (pg/ml)	p
IL-6	17	3 (3-941,2)	16	3 (3-275,5)	0,36
IL-8	17	285,3 (31,1-2.537)	16	170,7 (31,1-1.369)	0,54

Os dados estão representados em medianas (variações); ¥ valores outliers

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas concentrações dos mediadores inflamatórios em secreção nasofaríngea e no plasma no primeiro dia de internação (T1). No quinto dia de internação (T2), observou-se que os valores das concentrações de IL-6 foram 10,6 vezes mais altos na secreção nasofaríngea do grupo de crianças submetidas à ventilação mecânica. Além disso, os valores das concentrações de IL-8 nos pacientes que necessitaram de suporte ventilatório em T2 foram 1,4 vezes mais altos que os de pacientes não submetidos à ventilação mecânica.

Os valores destacados como *outliers* na tabela 11 pertencem a um mesmo paciente. A análise feita excluindo-se estes títulos também não resultou em significância estatística. A paciente em questão é portadora de anemia falciforme (sem diagnóstico à época da internação) e apresentou mais duas crises de broncoespasmo induzida por vírus nos 2 anos seguintes à primeira internação.

No primeiro dia de internação (T1), valores de IL-33 foram mais frequentemente detectáveis nas secreções nasofaríngeas do grupo submetido à ventilação mecânica (n=16), em comparação ao grupo de pacientes não submetidos à ventilação mecânica (n=6, 50% vs. 13,3%, respectivamente; p<0,001). De forma semelhante, concentrações de sST2 em secreção nasofaríngea em T1 foram mais frequentemente detectáveis naqueles submetidos à suporte ventilatório (n=28), em comparação com o grupo que não necessitou de suporte ventilatório (n=18, 87,5% vs 40,9%, respectivamente; p<0,001). No plasma, não houve diferença significativa entre os dois grupos quanto às frequências de detecções de IL-33 (p=0,46) ou do sST2 (p=0,5) em T1.

Dentre as coletas realizadas no quinto dia (T2), também não houve diferença significativa nas frequências de detecções entre os dois grupos avaliados. A IL-33 foi detectável em 8 amostras de secreção nasofaríngea no grupo de crianças submetidas à ventilação mecânica e em 5 amostras do grupo não submetido à ventilação mecânica (25,8% vs 13,2%; p=0,22). O sST2 foi detectável em 7

amostras de secreção nasofaríngea em pacientes que necessitaram de ventilação mecânica e em 4 amostras do grupo que não necessitou de ventilação mecânica (22,6% vs 10,5%; p=0,2). A IL-33 plasmática foi detectável em 9 amostras de pacientes submetidos à ventilação mecânica e em 10 pacientes que não necessitaram de suporte ventilatório (52,9% vs 62,5%; p=0,72). Já o sST2 plasmático foi detectado em 6 amostras de pacientes do grupo submetido à ventilação mecânica e em 3 pacientes do grupo que não necessitou de suporte ventilatório (35,3% vs 18,8%; p=0,43).

Foram comparadas as concentrações dos marcadores inflamatórios entre os dois tempos (T1 e T2), nos dois grupos, ventilação (tabelas 12 e 13) e não ventilação mecânica (tabelas 14 e 15).

Tabela 12 - Comparação entre as concentrações de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 em aspirado nasofaríngeo nos dois tempos de coleta, durante as primeiras 24h de internação (T1) e no quinto dia de internação (T2), no grupo de pacientes submetidos à ventilação mecânica (VM).

	Grupo VM				
	T1 (n=32)		**T2 (n=31)**		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	***p***
IL-33	32	0,186 (0,186-4.096)	31	0,186 (0,186-83,67)	0,54
ST-2	**32**	**5,63 (2,44-50.643)**	**31**	**2,44 (2,44-1.105)**	**0,03**
IL-1ß	30	66,7 (3,8-3.099)	31	182,1 (3,8-1.335)	0,98
TNFα	30	15,5 (15,5-391,8)	31	15,5 (15,5-158,6)	0,85
IL-4	**30**	**0,2 (0,2-13,5)**	**31**	**6,9 (5,3-12,2)**	**<0,01**
IL-6	32	235,5 (3-2.162)	31	152,6 (3-1.885)	0,91
IL-8	**32**	**342,9 (31,1-2.553)**	**31**	**1.113 (31,1-4.313)**	**<0,01**

Os dados estão representados em medianas (variações)

Tabela 13 – Comparação entre as concentrações de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 no plasma nos dois tempos de coleta, durante as primeiras 24h de internação (T1) e no quinto dia de internação (T2), no grupo de pacientes submetidos à ventilação mecânica (VM)

	Grupo VM				
	T1 (n=17)		**T2 (n=17)**		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	***p***
IL-33	17	0,186 (0,186-1.638)	17	0,78 (0,186-2.486)	0,13
ST-2	17	2,44 (2,44-140,8)	17	2,44 (2,44-1708)	0,34
IL-1ß	17	66,7 (3,8-136,4)	17	3,8 (3,8-1749)	0,25

	Grupo VM				
	T1 (n=17)		T2 (n=17)		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	***p***
L-4	17	0,2 (0,2-6.852)	17	4,34 (0,2-14,3)	0,22
IL-6	17	3 (3-769,6)	17	3 (3-941,2)	0,62
IL-8	17	104,5 (31,1-4.112)	17	285,3 (31,1-2.537)	0,76

Os dados estão representados em medianas (variações)

Não foi possível a comparação das concentrações de TNFα no plasma, em virtude da pequena quantidade de amostras com títulos detectáveis deste mediador inflamatório.

Tabela 14 - Comparação entre as concentrações de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 em aspirado nasofaríngeo nos dois tempos de coleta, durante as primeiras 24h de internação (T1) e o quinto dia de internação (T2), no grupo de pacientes não submetidos à ventilação mecânica (não-VM)

	Grupo não-VM				
	T1 (n=45)		T2 (n=38)		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	***p***
IL-33	45	0,186 (0,186-111.423)	38	0,186 (0,186-793,3)	0,42
ST-2	44	2,44 (2,44-168,9)	38	2,44 (2,44-853,6)	0,05
IL-1ß	44	154,8 (3,8-1.949)	37	45,1 (3,8-2.195)	0,56
TNFα	43	15,5 (15,5-2.728)	36	15,5 (15,5-640,5)	1,0
IL-4	43	0,2 (0,2-54.603)	35	5,3 (5,3-11,1)	**<0,01**
IL-6	44	86,0 (3-5.439)	38	14,4 (3-1.287)	**0,04**
IL-8	44	300,2 (31,1-4.493)	38	792,2 (31,1-4.505)	**<0,01**

Os dados estão representados em medianas (variações)

Tabela 15 – Comparação entre as concentrações de interleucinas, quimiocinas e receptor ST2 no plasma nos dois tempos de coleta, durante as primeiras 24h de internação (T1) e o quinto dia de internação (T2), no grupo de pacientes não submetidos à ventilação mecânica (não-VM)

	Grupo não-VM				
	T1 (n=19)		T2 (n=16)		
	n	**Valor (pg/ml)**	**n**	**Valor (pg/ml)**	***p***
IL-33	**19**	**0,186 (0,186-840,4)**	**16**	**36,2 (0,186-88.744¥)**	**0,04**
ST-2	19	13,0 (2,44-705,9)	16	2,44 (2,44-1159)	0,49
IL-1ß	18	154,8 (3,8-226)	16	3,8 (3,8-847,8)	0,13
IL-4	18	0,2 (0,2-75,3)	16	2,75 (0,2-85.900¥)	0,06
IL-6	19	3,2 (3-177,5)	16	3 (3-275,5)	0,64

	Grupo não-VM				
	T1 (n=19)		T2 (n=16)		
	n	Valor (pg/ml)	n	Valor (pg/ml)	*p*
IL-8	19	108,3 (31,1-4.219)	16	170,7 (31,1-1.369)	0,66

Os dados estão representados em medianas (variações); ¥ valores *outliers*

Observou-se redução das concentrações de ST-2 e aumento das concentrações de IL-4 e IL-8 em aspirado nasofaríngeo ao longo do tempo no grupo submetido à ventilação mecânica. No grupo não submetido à ventilação mecânica, observou-se redução das concentrações de IL-6 e aumento das concentrações de IL-4 e IL-8 em aspirado nasofaríngeo ao longo do tempo. Além disso, houve aumento significativo das concentrações plasmáticas de IL-33 ao longo do tempo no grupo não submetido à ventilação mecânica. A análise feita excluindo-se os valores *outliers* da mesma paciente também obteve significância estatística.

Construção de curvas ROC

Curvas ROC foram construídas para identificar ponto de corte nas concentrações em secreção nasofaríngea e plasma de cada um dos marcadores inflamatórios para predição da necessidade ou não de suporte ventilatório mecânico, durante as primeiras 24 horas e no quinto dia de internação hospitalar (tabelas 16 e 17, figura 3 e apêndice C).

Tabela 16 - Áreas sob a curva e intervalos de confiança das curvas ROC dos marcadores inflamatórios em secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite viral aguda, durante as primeiras 24h de internação (T1) e quinto dia de internação (T2) hospitalar, para predição de necessidade de ventilação mecânica

	Secreção nasofaríngea			
Marcador inflamatório	T1		T2	
	Área sob a curva	Intervalo de confiança 95%	Área sob a curva	Intervalo de confiança 95%
IL-33	0,55	0,46-0,64	0,56	0,47-0,66
ST2	0,57	0,44-0,69	0,56	0,47-0,65
IL-1ß	0,54	0,39-0,66	0,54	0,40-0,68
IL-4	0,47	0,36-0,59	0,54	0,39-0,67
IL-6	0,60	0,47-0,53	**0,72**	**0,72-0,83**
IL-8	0,49	0,36-0,63	0,65	0,58-0,78

Não foi possível construir curvas ROC para TNFα, pois a quantidade de amostras com concentrações detectáveis desta interleucina foi pequena, impossibilitando a análise estatística.

O biomarcador que apresentou a melhor área sob a curva foi a IL-6 em secreção nasofaríngea, no segundo tempo de coleta (Figura 3). O valor de 49,04 pg/ml apresentou sensibilidade de 71% e especificidade de 63% para predição de necessidade de ventilação mecânica.

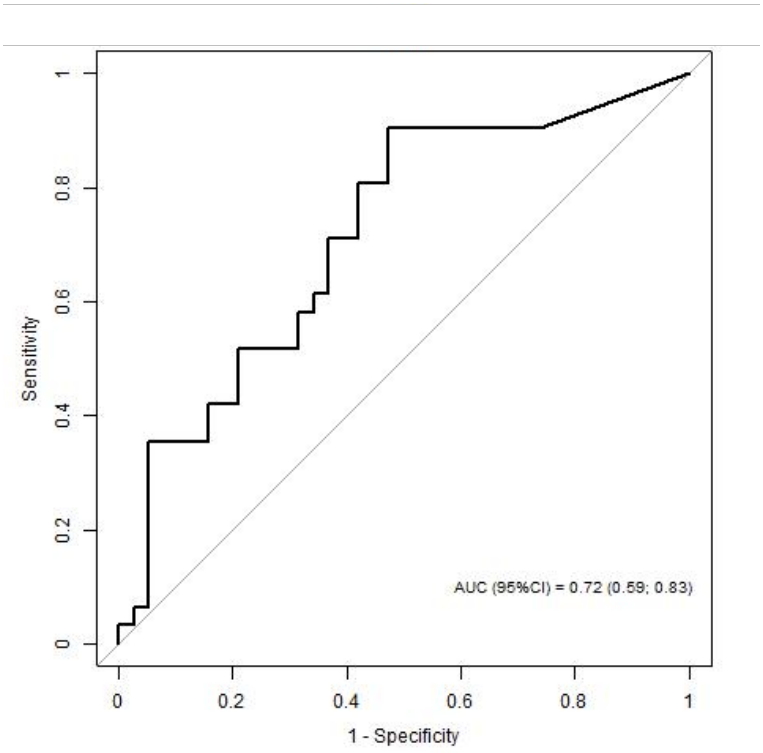


Figura 3 - Curva ROC da concentração de IL-6 em secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o quinto dia de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica.

Tabela 17 - Áreas sob a curva e intervalos de confiança das curvas ROC dos marcadores inflamatórios no plasma de pacientes com bronquiolite viral aguda, durante as primeiras 24h de internação (T1) e quinto dia de internação (T2) hospitalar para predição da necessidade de ventilação mecânica.

Plasma				
Marcador inflamatório	**T1**		**T2**	
	Área sob a curva	**Intervalo de confiança 95%**	**Área sob a curva**	**Intervalo de confiança 95%**
IL-33	0,58	0,44-0,73	0,59	0,40-0,78
ST2	0,61	0,43-0,76	0,59	0,44-0,74
IL-1ß	0,64	0,46-0,86	046	0,29-0,61
IL-4	0,56	0,38-0,73	0,46	0,26-0,64
IL-6	0,60	0,42-0,77	0,58	0,42-0,74
IL-8	0,53	0,36-0,73	0,56	0,36-0,77

7. Discussão

O presente estudo foi pioneiro na utilização de abrangente painel viral e de marcadores inflamatórios em secreção nasofaríngea e plasma de crianças de 0 a 5 anos, com o objetivo de avaliar a associação entre o eixo IL-33/ST2 e a gravidade da bronquiolite viral aguda. Embora diferenças nas concentrações de IL-33 e sST2 entre os dois grupos avaliados não tenham sido verificadas, as concentrações de IL-33 e de sST2 foram mais frequentemente detectáveis à admissão hospitalar no grupo de pacientes submetidos à ventilação mecânica. Além disso, as concentrações de IL-6 e IL-8 em secreção nasofaríngea foram mais elevadas no grupo de maior gravidade no quinto dia de internação. Por sua vez, a presença de coinfeções virais e diferentes etiologias não se associaram à gravidade da bronquiolite viral aguda. A implicação do eixo IL-33/ST2 na resposta inflamatória da asma, dermatite atópica e demais doenças inflamatórias e autoimunes na faixa etária pediátrica vem sendo alvo de inúmeras publicações recentes, inclusive no Brasil (QUEIROZ et al., 2017). Sua capacidade de modulação da resposta inflamatória tem sido demonstrada até mesmo na gênese da broncodisplasia pulmonar em prematuros (TUNC et al., 2014). A atuação da IL-33 na infecção respiratória viral foi demonstrada em tecido pulmonar de modelos murinos infectados pelo VSR (ZENG et al., 2015; LIU et al., 2015; SARAVIA et al., 2015; QI et al., 2015; STIER et al., 2016; QI et al., 2017), influenza (GOFFIC et al., 2011), rinovírus (JACKSON et al., 2014; MEHTA et al., 2016) e metapneumovírus (LAY et al., 2015). Entretanto, até o presente momento, poucos trabalhos têm buscado elucidar o funcionamento deste eixo, *in vivo*, nas doenças respiratórias virais da infância. Apenas três publicações abordaram as concentrações da IL-33 em secreções respiratórias de crianças com bronquiolite viral aguda, com resultados controversos. Saravia et al. (2015) demonstraram seu aumento no 1º dia de internação, quando comparado ao 28º dia, em 19 amostras de secreções nasofaríngeas de pacientes menores de 1 ano internados. Esta publicação abordou uma pequena amostra de crianças infectadas pelo VSR, sem estratificação por gravidade ou constituição de um grupo controle. Por sua vez, Christiaansen et al. (2016) encontraram correlação inversa entre concentrações de IL-33 e infecção pelo VSR, demonstrando que os títulos médios de IL-33 em secreções nasofaríngeas de 23 pacientes menores de 1 ano internados por doença respiratória secundária ao vírus sincicial foram inferiores

aos de 17 controles isentos de doença, mas sem significância estatística (médias 20,69 pg/ml e 13,87 pg/ml, respectivamente; p=0,0561). A publicação de Christiaansen e colaboradores representa também uma amostra muito pequena de lactentes e, além disso, excluiu pacientes graves. Por fim, García-García et al. (2017) avaliaram as concentrações de IL-33 em secreção nasal coletadas à admissão de 213 lactentes com bronquiolite viral aguda por VSR ou rinovírus. Observou-se maior número de detecções, além deconcentrações mais elevadas desta alarmina em comparação a grupo controle de 45 indivíduos saudáveis sem vírus identificados (p<0,01). Contudo, não houve diferença na comparação de pacientes que necessitaram de admissão em UTI com lactentes que manifestaram doença leve.

Um único trabalho avaliou as concentrações de sST2 em secreção nasofaríngea na faixa etária pediátrica (FABER et al., 2012). Uma Coorte de lactentes menores de 1 ano, multicêntrica, conduzida na Holanda e publicada em 2012, comparou 19 pacientes com bronquiolite viral aguda por vírus sincicial respiratório que necessitaram de intubação orotraqueal com 135 crianças que foram admitidas pela mesma doença, sem necessidade de intubação. As concentrações de sST2 coletados à admissão foram 20 vezes maiores no grupo de pacientes intubados (medianas 9.357 pg/ml [intervalo interquartil 936–15.528 pg/ml] e 405 pg/ml [intervalo interquartil 112–1.193 pg/ml], respectivamente; p<0.0001) (FABER et al., 2012). Para detectar o vírus sincicial respiratório, foi utilizado o teste de imunofluorescência, de menor sensibilidade, prejudicando a comparação com os resultados deste trabalho. Além disso, pacientes que foram submetidos à ventilação não-invasiva não foram mencionados por Faber e colaboradores, constituindo outro critério prejudicial a possíveis comparações entre os dados encontrados. No entanto, embora o número de pacientes intubados incluídos por Faber et al. (2012) seja menor, o grupo controle representado por crianças que não necessitaram de suporte ventilatório foi bem mais expressivo.

Nenhum outro trabalho analisou a IL-33 e o sST2 no plasma. Krychtiuk et al. (2017) sugeriram que níveis plasmáticos indetectáveis da IL-33 em adultos admitidos em UTI parecem diretamente correlacionados à mortalidade, tanto em pacientes clínicos, quanto em cirúrgicos. O mesmo tem sido observado em adultos criticamente enfermos, nos quais altas concentrações séricas de sST2 parecem correlacionadas a pior prognóstico, tendo sido associadas a estados inflamatórios

exacerbados na sepse, infarto agudo do miocárdio e trauma (KRYCHTIUK et al., 2017).

Pacientes submetidos à ventilação mecânica apresentaram, à admissão, detecções mais frequentes, em secreção nasofaríngea, tanto da IL-33, quanto do sST2, em comparação com aqueles não submetidos a suporte ventilatório. Este achado denota a rápida ativação do eixo IL-33/sST2, mais proeminente entre os pacientes graves. O número de amostras detectadas da IL-33 no grupo VM mostrou-se quase 4 vezes maior comparado ao grupo não submetido à VM. Para as amostras de sST2, esta proporção foi o dobro.

A mesma associação não foi observada nos aspirados nasofaríngeos durante o segundo tempo de coleta. Contudo, detectou-se redução significativa das concentrações do receptor sST2 em secreção nasofaríngea no grupo de maior gravidade durante a evolução da internação, provavelmente sugerindo infrarregulação local destas vias. No grupo de crianças não ventiladas o valor de p foi de 0,05, na comparação entre as concentrações deste receptor em secreção nasofaríngea durante o primeiro e o quinto dia de internação hospitalar. Apesar das medianas de suas concentrações terem sido as mesmas em ambos os tempos de coleta, o valor máximo durante o quinto dia de internação apresentou-se mais elevado que o valor máximo do primeiro dia, Esta análise, porém, pode ter sido prejudicada pela baixa quantidade de amostras detectáveis de sST2 neste segundo período avaliado.

Pacientes que não necessitaram de suporte ventilatório demonstraram aumento estatisticamente significativo das concentrações séricas da IL-33 no plasma durante a evolução da internação hospitalar. A ativação sistêmica da IL-33 foi acompanhada por redução nas concentrações locais da IL-6, observada apenas neste grupo de menor gravidade. A IL-33 apresenta função modulatória sobre a IL-6, principalmente por sua ação em células dendríticas (CARRASCO et al., 2015). Pyle et al. (2017) se concentraram no estudo da dinâmica da IL-6 na regulação da resposta imune durante as infecções respiratórias virais. Observaram que aumento robusto e precoce (durante as primeiras 24 horas da infecção) desta citocina é necessário para resposta protetora contra a infecção viral. Conforme constatado no presente estudo, concentrações da IL-6 em camundongos também apresentaram queda após o período inicial da infecção. A partir do 4º ao 7º dia, a atividade da IL-6

pareceu limitar a resposta Th1 nos modelos murinos, auxiliando na resolução do processo. No presente estudo, as concentrações de IL-6 na secreção respiratória só foram significativamente diferentes entre os grupos no quinto dia de internação, sugerindo que, apesar de ambos os grupos terem sido capazes de produzir resposta robusta, a modulação da atividade da IL-6 durante a evolução da doença poderia ser responsável pelo melhor desfecho dos pacientes que não necessitaram de ventilação mecânica. Estes achados, entretanto, contrariam aqueles encontrados por Pyle et al. (2017), que observaram que o aumento das concentrações desta proteína não determinaram pior desfecho nos dias subsequentes à infecção de seus modelos animais.

Com o objetivo de se identificarem pontos de corte nos valores dos marcadores inflamatórios para a discriminação da gravidade da doença, curvas ROC foram geradas, dentre as quais se destacou a área sob a curva da IL-6 durante o quinto dia de internação na secreção nasofaríngea. Somente Díaz et al. (2015) procuraram estabelecer pontos de corte para a IL-6, IL-8 e IL-1ß em secreção nasal, na comparação entre 115 lactentes com bronquiolite viral aguda e 38 controles livres de doença. Os autores sugeriram um ponto de corte de 120,0 pg/ml para a IL-6, com área sob a curva de 0,82, sensibilidade de 82,1% e especificidade de 74,1%. Para esta análise, todavia, foram excluídos pacientes que necessitaram de ventilação mecânica e possuíam quaisquer comorbidades. O critério de gravidade utilizado pelos autores foi tempo de oxigenoterapia superior a 2 dias. Este valor proposto, de acordo com nossos dados, apresentaria sensibilidade bem baixa, de 52% e especificidade entre 71-74%, não servindo, portanto, ao objetivo proposto.

O incremento da IL-8 observado durante o quinto dia, significativo inclusive na análise estatística entre os grupos de pacientes graves e menos graves, reflete a infiltração neutrofílica característica da resposta do organismo aos vírus respiratórios. Cavallaro et al. (2017) demonstraram que, independente da etiologia viral, grande parte da reação inflamatória ocorre pelo afluxo de neutrófilos para o tecido afetado, sendo a IL-8 parte essencial neste processo, objetivando conter o avanço do vírus. Entretanto, foi observado que a obstrução das vias aéreas por muco e rolhas de secreção se deve ao acúmulo na formação de redes extracelulares de neutrófilos no epitélio respiratório. Alguns autores verificaram, inclusive, aumento da IL-8 sistêmica e local correlacionado à hipóxia e necessidade de ventilação

mecânica em lactentes enfermos (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

A IL-4 constituiu a única interleucina característica da resposta Th2 dentre os marcadores inflamatórios avaliados. De forma semelhante aos resultados encontrados, García et al. (2012) também descreveram títulos baixos de IL-4 detectados nas amostras, o que poderia representar uma ineficácia da resposta celular em crianças mais novas. A despeito deste achado, foi constatado o aumento de suas concentrações em secreção respiratória durante a evolução da internação hospitalar em ambos os grupos, porém sem diferenças significativas na comparação por gravidade da doença. Apesar dos títulos da IL-4 não terem evidenciado associação com maior gravidade da bronquiolite, destaca-se que tal aumento poderia refletir a já discutida polarização Th2, propiciando esta população de pacientes à quadros de sibilância de repetição e asma (WALZL et al., 2001; BERMEJO-MARTIN et al., 2007; LAMBERT et al., 2014; ESPINOZA et al., 2014; ARRUVITO; RAIDEN; GEFFNER, 2015; CARRASCO et al., 2015; BOHMWALD et al., 2016; RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017). Em oposição aos achados deste trabalho, Nicholson e colaboradores (2016) demonstraram que crianças com bronquiolite viral aguda que não necessitaram de internação possuíam níveis mais elevados desta interleucina em secreções respiratórias, quando comparados aos títulos de crianças internadas pela mesma doença.

Ainda que o aumento das citocinas IL-1ß e TNF-α seja frequentemente associado à maior gravidade da bronquiolite em algumas publicações nos últimos anos (MCNAMARA et al., 2004; MELLA et al., 2013; TABARANI et al., 2013; DÍAZ et al., 2013; DÍAZ et al., 2015; CAVALLARO et al., 2016), não foram constatadas tais associações no presente estudo. Entretanto, o conceito de que a evolução desfavorável da bronquiolite viral aguda esteja associado ao aumento destas citocinas e quimiocinas ainda persiste como motivo de grande divergência entre as publicações: enquanto alguns observaram correlação, tanto em secreção nasal, quanto no plasma, entre o aumento dos marcadores inflamatórios IL-6, IL-8, TNFα e IL-1ß e aumento da gravidade dos quadros respiratórios (FEGHALY et al., 2012; DÍAZ et al., 2013; TABARANI et al., 2013; DÍAZ et al., 2015; BOHMWALD et al., 2016; CAVALLARO et al., 2016), outros detectaram este aumento como fator de proteção contra as formas mais graves da doença (BENNETT et al., 2007; GARCÍA et al., 2012). Verificou-se, contudo, ampla diversidade nas populações e metodologias empregadas nestes estudos com desenhos semelhantes

(MCNAMARA et al., 2004; BENNETT et al., 2007; GARCÍA et al., 2012; FABER et al., 2012; TABARANI et al., 2013; MELLA et al., 2013; SARAVIA et al., 2015; DÍAZ et al., 2015; CHRISTIAANSEN et al., 2016; CAVALLARO et al., 2016; GARCÍA-GARCÍA et al., 2017) o que acarretou dificuldade na comparação entre os resultados.

Foi observada heterogeneidade entre os trabalhos quanto aos critérios de gravidade e desfechos utilizados, dentre eles: necessidade e tempo de internação hospitalar (BENNETT et al., 2007; GARCÍA et al., 2012; MELLA et al., 2013), TABARANI et al., 2013; SARAVIA et al., 2015; DÍAZ et al., 2015), indicação e tempo de internação em UTI (TABARANI et al., 2013; GARCÍA- GARCÍA et al., 2017) oxigenoterapia (BENNETT et al., 2007; GARCÍA et al., 2012; DÍAZ et al., 2015; GARCÍA- GARCÍA et al., 2017), necessidade de ventilação mecânica (FABER et al., 2012), idade gestacional (MCNAMARA et al., 2004), presença ou ausência de doença respiratória pelo VSR (CHRISTIAANSEN et al., 2016) e escores de gravidade (GARCÍA et al., 2012; MELLA et al., 2013). A composição dos grupos para comparação da resposta inflamatória entre os pacientes também se apresentou distinta entre as publicações: doentes e não doentes (CHRISTIAANSEN et al., 2016; CAVALLARO et al., 2016; GARCÍA- GARCÍA et al., 2017) ambulatoriais e internados (BENNETT et al., 2007; TABARANI et al., 2013; SARAVIA et al., 2015; DÍAZ et al., 2015), necessidade de admissão em UTI (TABARANI et al., 2013; GARCÍA-GARCÍA et al., 2017), necessidade de ventilação mecânica (FABER et al., 2012) e etiologias virais (vírus sincicial respiratório e rinovírus) (CAVALLARO et al., 2016; GARCÍA- GARCÍA et al., 2017). Além disso, com exceção de Tabarani et al. (2013), que incluíram número maior de participantes, as demais publicações revisadas foram caracterizadas por amostra pequena de pacientes.

A escolha de incluir crianças abaixo de 5 anos de idade, apesar de grande parte dos estudos avaliarem apenas lactentes (MCNAMARA et al., 2004; BENNETT et al., 2007; GARCÍA et al., 2012; FABER et al., 2012; MELLA et al., 2013; SARAVIA et al., 2015; DÍAZ et al., 2015; CHRISTIAANSEN et al., 2016; CAVALLARO et al., 2016; GARCÍA-GARCÍA et al., 2017), se deu a partir de recentes avanços no conhecimento das particularidades da doença respiratória de etiologia viral, cuja progressão é influenciada por variações nas interações do epitélio respiratório com os vírus infectantes, pela maturidade do sistema imunológico do hospedeiro e por seu potencial genético e epigenético, resultanto em uma gama diversa de respostas

imunes possíveis (HACKETT et al., 2011; IOANNIDIS et al., 2012; MEJIAS et al., 2013; RODRIGUEZ-FERNANDEZ et al., 2017; HILLYER et al., 2018). Frente a esses conceitos, o entendimento da bronquiolite viral aguda como doença que abrange somente o primeiro episódio de sibilância em lactentes se tornou obsoleto, já que a resposta do organismo à doença é resultante das interações de todos os fatores acima mencionados, os quais não se limitam a faixa etária específica (KUZIK, 2016). Além disso, publicações que abrangem o impacto global da doença viral têm incluído todas as crianças abaixo de 5 anos, por constituir o período mais susceptível às infecções respiratórias virais e/ou bacterianas (NAIR et al., 2010; SHI et al., 2017; SCHELTEMA et al., 2017; STEIN et al., 2017).

Apesar desta diferença nos critérios de inclusão, McNamara et al. (2004), Faber et al. (2012), Mella et al. (2013) e Saravia et al. (2015) descreveram médias e medianas das idades de seus pacientes entre 1 e 3 meses, semelhantes à encontrada neste estudo. Entre as demais publicações sobre o assunto, os lactentes avaliados eram pouco mais velhos, entre 3 (CHRISTIAANSEN et al., 2016; GARCÍA-GARCÍA et al., 2017) e 6 meses (BENNETT et al., 2007; GARCÍA et al., 2012; TABARANI et al., 2013). Quanto a presença de prematuridade, um dos fatores de risco prognósticos mais frequentemente citados na literatura, (KHOLY et al., 2013; NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2015; SHI et al., 2015; HASEGAWA et al., 2015; MEISSNER, 2016; FLORES-GONZÁLEZ et al., 2017; TOURNIAIRE et al., 2018) o número de crianças com idade gestacional abaixo de 37 semanas incluído foi comparável aos dados de Mcnamara et al. (2004), os quais avaliaram 23 prematuros. Contudo, a média da idade gestacional foi menor no trabalho publicado por estes autores, 30,1 semanas (desvio-padrão de 3,6 semanas). Quatro outros estudos descreveram menores prevalências de prematuridade, entre 11,8 a 17,3% (BENNETT et al., 2007; TABARANI et al., 2013; CHRISTIAANSEN et al., 2016; GARCÍA-GARCÍA et al., 2017) e, além disso, não discriminaram suas idades gestacionais. Saravia et al. (2015) os excluíram de suas análises e os demais, García et al. (2012), Faber et al. (2012), Mella et al. (2013), Díaz et al. (2015) e Cavallaro et al. (2016) não os mencionaram. A mediana do peso encontrada foi próxima à descrita em crianças a termo com bronquiolite por McNamara et al. (2004), 4,2 kg (desvio-padrão de 1,2 kg), os únicos a descreverem esta variável.

O sexo masculino, descrito como fator de risco por alguns autores

(NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2015), é o sexo predominante nas internações por bronquiolite viral aguda, variando de 54% (GANU et al., 2012) a 60,3% (HERVÁS et al., 2012). Dentre os trabalhos sobre marcadores inflamatórios em crianças avaliados, apenas McNamara et al. (2004) não encontraram esta predominância (40% apenas).

Nenhum dos fatores de risco que podem contribuir para pior desfecho apresentou significância estatística entre os dois grupos avaliados. Embora pacientes previamente hígidos que desenvolvem bronquiolite viral aguda descritos na literatura constituam em torno de 75% do total dos pacientes que necessitam de internação (HALL et al., 2009; GEOGHEGAN et al., 2017; FLORES-GONZÁLEZ et al., 2017), encontramos que apenas aproximadamente 30% deles não eram portadores de alguma comorbidade, o que pode ter sido uma consequência do perfil terciário das internações hospitalares.

Outros sinais clínicos, radiológicos e laboratoriais que também foram reconhecidos como de alto risco para má evolução, como cianose/hipoxemia e frequência respiratória acima de 70 incursões por minuto durante o primeiro dia de internação (KHOLY et al., 2013; HASEGAWA et al., 2015; GEOGHEGAN et al., 2017) não apresentaram diferenças significativas entre os desfechos estudados. As variáveis que comprovaram a maior gravidade da população de pacientes submetidos à ventilação mecânica foram os escores de gravidade e os tempos de oxigenoterapia e de duração da internação hospitalar. Ademais, crianças submetidas à ventilação possuíam leucometria global mais baixa, sem diferença entre as proteínas C reativas, além de maior frequência de atelectasias. Tais achados evidenciam a imaturidade do sistema imune e respiratório do lactente jovem (CEBEY-LÓPEZ et al., 2015; MEISSNER, 2016; FLORIN; PLINT; ZORC, 2017). Linfopenia resultante de baixa contagem de células T citotóxicas, característica da primeira semana de doença respiratória viral, foi diretamente correlacionada com a carga viral e gravidade clínica, e inversamente associada à idade do paciente (RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

Apesar de aproximadamente 70% dos pacientes sob ventilação mecânica terem recebido, em algum momento da internação, diagnóstico de pneumonia e sido submetidos à terapia antimicrobiana, observou-se, à admissão, baixos títulos das proteínas C reativas em ambos os grupos e ausência de hemoculturas positivas para micro-organismos de etiologia bacteriana. Este estudo não distinguiu, no entanto, os

diagnósticos de infecção bacteriana secundária à admissão daqueles que evoluíram com pneumonia associada à ventilação mecânica. Também não foram registrados outros valores de leucometria global ou proteína C reativa que não os da admissão hospitalar.

Somente estudos epidemiológicos, realizados por Ganu et al. (2012) e Essouri et al. (2017), avaliaram pacientes em ventilação não-invasiva, demonstrando sua utilização cada vez mais prevalente, entre 40,3% e 88,3% dos pacientes internados em UTI. A quantidade de pacientes submetidos à ventilação invasiva em publicações que avaliaram marcadores de gravidade em bronquiolite viral aguda variou de 4 (em um período de 1 ano) a 47 indivíduos (num período de 2 anos) (GARCÍA et al., 2012; MCNAMARA et al., 2004). Os trabalhos cujo número de pacientes se aproximou ao deste estudo foram Bennett et al. (2007) (n=23, num período de 2 anos; 23,4% do total de pacientes incluídos) e Faber et al. (2012) (n=19, num período de 2 anos; 17,4% do total).

Encontramos maior proporção de infecções por VSR (83,3%), quando comparados aos dados da literatura, os quais variam entre 50-80% (MEISSNER, 2016). O rinovírus foi o segundo agente mais comumente isolado (34,7%), conforme encontrado em grande parte das publicações, que relatam este vírus como o agente causal em até 38% dos casos (CEBEY-LÓPEZ et al., 2015; MEISSNER, 2016; FLORIN; PLINT; ZORC, 2017). Em relação aos demais agentes detectados, há grande variabilidade entre os autores quanto às prevalências, provavelmente relacionada às diferentes regiões, períodos e populações analisadas. No estudo etiológico conduzido em Ribeirão Preto durante o ano de 2005 por Gagliardi et al. (2013), o segundo vírus mais comumente detectado foi o adenovírus, seguido pelo picornavírus, bocavírus, metapneumovírus, rinovírus e enterovírus. Nascimento et al. (2010) encontraram, durante o ano de 2006 e 2007, o rinovírus como segundo vírus mais comum (33,8%), seguido do metapneumovírus (15,6%) e influenza (2,6%). O adenovírus não foi detectado em nenhuma amostra. Já no estudo de Silva et al. (2013), realizado no Rio Grande do Sul em 2007, o metapneumovírus foi o segundo agente mais isolado (32,3%), seguido do rinovírus (20,8%), influenza (12,7%) e adenovírus (6,5%).

No que concernem as publicações sobre dosagens de marcadores inflamatórios, Díaz et al. (2015), Christiaansen et al. (2016), Cavallaro et al. (2016) e García-García et al. (2017) avaliaram pacientes infectados por rinovírus, além do

vírus sincicial. Em conjunto com outros estudos, estes autores afirmam que o VSR, à exceção das infecções pelo vírus influenza (MEJIAS et al., 2013; MANUKYAN et al., 2018), parece produzir resposta inflamatória mais robusta, em comparação aos demais vírus (WELLIVER; REED; WELLIVER, 2008; GARCÍA et al., 2012; ESPINOZA et al., 2014; DÍAZ et al., 2015; SHI et al., 2015; ADAMS et al., 2015; VANDINI et al., 2017; PARK et al., 2017). No entanto, embora tais evidências sugiram plasticidade vírus-específica na resposta imune inicial das células epiteliais respiratórias (IOANNIDIS et al., 2012), a resposta predominantemente neutrofílica demonstrada em lactentes doentes parece ser independente do vírus causador (MEJIAS et al., 2013; KOLLI et al., 2014; BROWN; SCHNEEBERGER; PIEDIMONTE, 2015; CAVALLARO et al., 2017; RODRIGUEZ-FERNANDEZ et al., 2017; RUSSELL; UNGER; WALTON, 2017).

Embora Silva et al. (2013) tenham concluído que crianças com coinfecções de vias aéreas inferiores por VSR e rinovírus apresentaram internações mais prolongadas quando comparadas às outras etiologias virais, Gagliardi et al. (2013) não demonstraram tal correlação, comparando os pacientes de acordo com escores de gravidade. A presença de coinfecção viral também não demonstrou correlação com os pacientes submetidos à ventilação mecânica avaliados neste estudo, assim como demonstrado em metanálise por Lim et al. (2016). Tabarani et al. (2013) avaliaram os subtipos do VSR e encontrou correlação entre o VSR subtipo A e o risco de hospitalização. Ainda que o VSR subtipo A tenha sido o mais prevalente entre os pacientes, não se verificou associação entre este agente etiológico e risco aumentado para necessidade de suporte ventilatório.

Uma das críticas ao presente estudo gira em torno da possibilidade de que as alterações encontradas nas dosagens dos marcadores inflamatórios possam ser influenciadas, ou, até mesmo, diretamente causadas, pela presença de ventilação mecânica e não pela resposta imune à bronquiolite viral aguda. Hennus et al. (2013) concluíram que o aumento das citocinas IL-1α, IL-1β, IL-6 e MCP-1 em secreção respiratória de 18 pacientes com bronquiolite viral aguda que necessitaram de intubação orotraqueal esteve correlacionado à presença de ventilação mecânica, após comparação com o mesmo número de lactentes com bronquiolite que não foram submetidos a este procedimento. McNamara et al. (2004), em contrapartida, encontraram concentrações de TNF-α e IL-6 superiores em dois momentos distintos da ventilação mecânica, no primeiro dia de intubação orotraqueal e no dia da

extubação de 70 lactentes a termo e prematuros com bronquiolite viral aguda por VSR, quando comparados a grupo controle constituído por 10 lactentes a termo intubados para cirurgia cardíaca ou abdominal, excluindo, portanto, este viés.

O uso de corticosteroides representou um dos grandes limitadores do estudo, responsável por 59,7% das exclusões e evidenciou a utilização indiscriminada desta medicação, gerando custos desnecessários e efeitos deletérios aos pacientes (FERNANDES et al., 2014). Tabarani et al. (2012) descreveram seu uso em 24% dos pacientes avaliados em seu estudo.

Outras limitações encontradas em nossas análises que devem ser mencionadas são a não correção das dosagens de biomarcadores pela dosagem de proteína na secreção mucosa e a inclusão de perfil muito heterogêneo de pacientes e etiologias virais. Soma-se a isso uma resposta inflamatória não muito distinta entre os pacientes que necessitaram de internação, que se caracterizaram por casos moderados e graves, apenas, conforme demonstrado pelos escores de gravidade empregados. Também devem ser destacadas a ausência de grupo controle de pacientes saudáveis adequados, a versatilidade da IL-33 e demais interleucinas da resposta imune inata (CARRASCO et al., 2015), limitações na técnica do aspirado nasofaríngeo convencional (diluição das citocinas abaixo do limite de detecção)(FØLSGAARD et al., 2012) e limitações de detecção dos kits de dosagem de interleucinas (FØLSGAARD et al., 2012).

8. Conclusão

Detecções mais frequentes da IL-33 e do receptor ST2 durante a admissão hospitalar e concentrações elevadas de IL-6 e IL-8 em secreção nasofaríngea durante o quinto dia da internação foram associadas à gravidade da bronquiolite viral aguda. Não houve associação entre as etiologias virais ou a presença de coinfecções e a gravidade da doença.

Referências Bibliográficas

ALVES-FILHO, J. C. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. Nature Medicine, v. 16, n. 6, p. 708 – 712, 2010.

ARRUVITO, L.; RAIDEN, S.; GEFFNER, J. Host response to respiratory syncytial virus infection. Current Opinion in Infectious Diseases, v. 28, n. 3, p. 259 – 266, 2015.

BAMBERGER, E. et al. What is the clinical relevance of respiratory syncytial virus bronchiolitis ?: findings from a multi-center , prospective study. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 31, n. 12, p. 3323 – 3330, 2012.

BENNETT, B. L. et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. Journal of Infectious Diseases, v. 195, n. 10, p. 1532 – 1540, 2007.

BERMEJO-MARTIN, J. F. et al. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. European Cytokine Network, v. 18, n. 3, p. 162 – 167, 2007.

BOHMWALD, K. et al. Human Respiratory Syncytial Virus: Infection and Pathology. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, v. 37, n. 4, p. 522 – 537, 2016.

BROWN, P. M.; SCHNEEBERGER, D. L.; PIEDIMONTE, G. Biomarkers of respiratory syncytial virus (RSV) infection: specific neutrophil and cytokine levels provide increased accuracy in predicting disease severity. Paediatric Respiratory Reviews, v. 16, n. 4, p. 232 – 240, Setembro 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152605421500038X>.

CABALLERO, M. T.; POLACK, F. P. Respiratory syncytial virus is an “opportunistic” killer. Pediatric Pulmonology, v. 53, n. 5, p. 664 – 667, Fevereiro 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppul.23963>.

CARRASCO, T. G. et al. Alarmin’ immunologists: IL-33 as a putative target for modulating T cell-dependent responses. Frontiers in Immunology, v. 232, n. 6, p. 4 – 11, Junho 2015.

CAVALLARO, E. C. et al. Neutrophil infiltration and activation in bronchiolitic airways are independent of viral etiology. Pediatric Pulmonology, v. 52, n. 2, p. 238 – 246, Fevereiro 2017. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L72050474>.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. Immunological Reviews, v. 281, n. 1, p. 154 – 168, 2018.

CEBEY-LÓPEZ, M. et al. Viral co-infections in pediatric patients hospitalized with lower tract acute respiratory infections. PLoS ONE, v. 10, n. 9, p. e0136526 –, 2015.

CHECCHIA, P. A. et al. Defining the Epidemiology and Burden of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Infants and Children in Western Countries. Infectious Diseases and Therapy, v. 5, n. 3, p. 271 – 298, 9 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40121-016-0123-0>.

CHRISTIAANSEN, A. F. et al. Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants. Pediatric Research, v. 80, n. 5, p. 702 – 709, 2016.

CINTRA, O. et al. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in Southeast Brazil. Journal of Medical Virology, v. 65, n. 2, p. 408 – 412, Outubro 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.2049>.

DÍAZ, P. V. et al. Aumento de interleuquinas proinflamatorias y de cortisol plasmático en bronquiolitis por virus respiratorio sincicial: relación con la gravedad de la infección. Revista médica de Chile, v. 141, n. 5, p. 574 – 581, Maio 2013. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872013000500004&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

DÍAZ, P. V. et al. Pro-Inflammatory Cytokines in Nasopharyngeal Aspirate From Hospitalized Children With Respiratory Syncytial Virus Infection With or Without Rhinovirus Bronchiolitis, and Use of the Cytokines as Predictors of Illness Severity. Medicine, v. 94, n. 39, p. e1512 –, 2015.

DINARELLO, C. A. Introduction to the interleukin-1 family of cytokines and receptors: Drivers of innate inflammation and acquired immunity. Immunological Reviews, v. 281, n. 1, p. 5 – 7, 2018.

ESPINOZA, J. A. et al. Modulation of host adaptive immunity by hRSV proteins. Virulence, v. 5, n. 7, p. 740 – 751, Outubro 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4189880&tool=pmcentrez& rendertype=abstract>.

ESSOURI, S. et al. Variability of Care in Infants with Severe Bronchiolitis: Less-Invasive Respiratory Management Leads to Similar Outcomes. The Journal of Pediatrics, v. 188, p. 156 – 162.e1, Setembro 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347617306546>. Acesso em: 2018-03-17T00:00:00+00:00.

FABER, T. E. et al. IL1RL1 gene variants and nasopharyngeal IL1RL-a levels are associated with severe RSV bronchiolitis: A multicenter cohort study. PLoS ONE, v. 7, n. 5, p. 19 – 23, 2012.

FEGHALY, R. E. E. et al. Local production of inflammatory mediators during childhood parainfluenza virus infection. Pediatric Infectious Disease Journal, v. 29, n. 4, p. 1 – 17, 2012.

FERNANDES, R. M. et al. Acute viral bronchiolitis: Physician perspectives on definition and clinically important outcomes. Pediatric Pulmonology, v. 51, n. 7, p. 724

– 732, 2016.

FERNANDES, R. M. et al. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. Cochrane Database of Systematic Reviews, v. 311, n. 4, p. 87 – 88, Junho 2013.

FLORES-GONZÁLEZ, J. C. et al. Prospective Multicentre Study on the Epidemiology and Current Therapeutic Management of Severe Bronchiolitis in Spain. BioMed research international, v. 2017, p. 1 – 7, Março 2017.

FLORIN, T. A.; PLINT, A. C.; ZORC, J. J. Viral bronchiolitis. The Lancet, v. 389, n. 10065, p. 211 – 224, Janeiro 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30951-5http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616309515>.

FØLSGAARD, N. V. et al. Neonatal cytokine profile in the airway mucosal lining fluid is skewed by maternal atopy. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 185, n. 3, p. 275 – 280, 2012.

FUENTE, M.; MACDONALD, T. T.; HERMOSO, M. A. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. Cytokine & Growth Factor Reviews, v. 26, n. 6, p. 615 – 623, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.017>.

GAGLIARDI, T. B. et al. Human bocavirus respiratory infections in children. Epidemiology and infection, v. 137, n. 7, p. 1032 – 6, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19134237>.

GAGLIARDI, T. B. et al. Concurrent detection of other respiratory viruses in children shedding viable human respiratory syncytial virus. Journal of Medical Virology, v. 85, n. 10, p. 1852 – 1859, 2013.

GANU, S. S. et al. Increase in use of non-invasive ventilation for infants with severe bronchiolitis is associated with decline in intubation rates over a decade. Intensive Care Medicine, v. 38, n. 7, p. 1177 – 1183, Julho 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00134-012-2566-4>.

GARCÍA, C. et al. Decreased Innate Immune Cytokine Responses Correlate With Disease Severity in Children With Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinovirus Bronchiolitis. The Pediatric Infectious Disease Journal, v. 31, n. 1, p. 86 – 89, 2012.

GARCÍA-GARCÍA, M. L. et al. Thymic stromal lymphopoietin and periostin in hospitalized infants with viral bronchiolitis. Medicine, v. 96, n. 18, p. e6787 –, 2017. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed18b&NEWS=N&A=612158793>.

GARDNER, P. Virus Infections and Respiratory Disease of Childhood. Archives of Diseases in Childhood, v. 43, n. 232, p. 629 – 645, Dezembo 1968.

GARIBALDI, B. T.; ILLEI, P.; DANOFF, S. K. Bronchiolitis. Immunology Allergy Clinics of North America, v. 32, n. 4, p. 601 – 619, 2012.

GEOGHEGAN, S. et al. Mortality due to Respiratory Syncytial Virus. Burden and Risk Factors. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 195, n. 1, p. 96 – 103, 1 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27331632http://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201603-0658OC>.

GOFFIC, R. L. et al. Infection with influenza virus induces IL-33 in murine lungs. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, v. 45, n. 6, p. 1125 – 1132, 2011.

HACKETT, T. L. et al. Intrinsic phenotypic differences of asthmatic epithelium and its inflammatory responses to respiratory syncytial virus and air pollution. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, v. 45, n. 5, p. 1090 – 1100, 2011.

HALL, C. B. et al. Respiratory Syncytial Virus-Associated Hospitalizations Among Children Less Than 24 Months of Age. Pediatrics, v. 132, n. 2, p. e341 – e348, 2013. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2013-0303>.

HALL, C. B. et al. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. New England Journal of Medicine, v. 360, n. 6, p. 588 – 598, Fevereiro 2009. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4829966/pdf/nihms763002.pdf>. Acesso em: 2018-03-17.

HAN, X. et al. Natural helper cells mediate respiratory syncytial virus-induced airway inflammation by producing type 2 cytokines in an IL-33-dependent manner. Immunotherapy, v. 9, n. 9, p. 715 – 722, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih. gov/pubmed/28771101>.

HASEGAWA, K. et al. Risk factors for requiring intensive care among children admitted to ward with bronchiolitis. Academic pediatrics, v. 15, n. 1, p. 77 – 81, 2015. Disponível em:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4454380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

HENNUS, M. P. et al. Mechanical ventilation drives inflammation in severe viral bronchiolitis. PLoS ONE, v. 8, n. 12, p. 8 – 12, 2013.

HERVÁS, D. et al. Epidemiology of hospitalization for acute bronchiolitis in children: differences between RSV and non-RSV bronchiolitis. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 31, n. 8, p. 1975 – 1981, Agosto 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-011-1529-y>.

HILLYER, P. et al. Differential responses by human respiratory epithelial cell lines to respiratory syncytial virus reflect distinct patterns of infection control. Washington DC: American Society of Microbiology, 2018. JVI.02202 – 17 p. Accepted manuscript posted online. Journal of Virology. 2018 May 16. pii: JVI.02202-17. doi:

10.1128/JVI.02202-17. [Epub ahead of print].

IOANNIDIS, I. et al. Plasticity and Virus Specificity of the Airway Epithelial Cell Immune Response during Respiratory Virus Infection. Journal of Virology, v. 86, n. 10, p.5422 – 5436, Maio 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347264/pdf/zjv5422.pdf>. Acesso em: 2018-05-19.

IWANE, M. K.; FARNON, E. C.; GERBER, S. I. Importance of global surveillance for respiratory syncytial virus. Journal of Infectious Diseases, v. 208, n. SUPPL. 3, p. 2 – 3, 2013.

JACKSON, D. J. et al. IL-33-Dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 190, n. 12, p. 1373 – 1382, 2014.

KHOLY, A. A. E. et al. Morbidity and outcome of severe respiratory syncytial virus infection. Pediatrics International, v. 55, n. 3, p. 283 – 288, Junho 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316763>.

KOLLI, D. et al. Alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of human metapneumovirus infection while protecting against respiratory syncytial virus infection. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, v. 51, n. 4, p. 502 – 515, 2014.

KRYCHTIUK, K. A. et al. Predictive value of low interleukin-33 in critically ill patients. Cytokine, v. 103, n. May 2017, p. 109 – 113, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466617302740>.

KUZIK, B. A. Maybe there is no such thing as bronchiolitis. Canadian Medical Association Journal, v. 188, n. 5, p. 351 – 354, Março 2016. Disponível em: <http://www.cmaj.ca/cgi/doi/10.1503/cmaj.150683>.

LAMBERT, L. et al. Immunity to RSV in early-life. Frontiers in Immunology, v. 5, n. 1, p. 1 – 14, Setembro 2014.

LAY, M. K. et al. Human metapneumovirus infection activates the TSLP pathway that drives excessive pulmonary inflammation and viral replication in mice. European journal of immunology, v. 45, n. 6, p. 1680 – 1695, Junho 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201445021>.

LE, H. et al. Interleukin-33: A Mediator of Inflammation Targeting Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Their Progenies. Frontiers in Immunology, v. 104, n. 4, p. 1 – 9, Maio 2013. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013. 00104/abstract>. Acesso em: 2018-04-30.

LEGAND, A. et al. Addressing the public health burden of respiratory viruses: the Battle against Respiratory Viruses (BRaVe) Initiative. Journal of Infectious Diseases, v. 8, n. 10, p. 953 – 968, Outubro 2013. Disponível em:

<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fvl.13.85>.

LIM, F. J. et al. Systematic review and meta-analysis of respiratory viral coinfections in children. Respirology, v. 21, n. 4, p. 648 – 655, 2016.

LIU, J. et al. Natural helper cells contribute to pulmonary eosinophilia by producing IL-13 via IL-33/ST2 pathway in a murine model of respiratory syncytial virus infection. International Immunopharmacology, v. 28, n. 1, p. 337 – 343, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.035>.

MANSBACH, J. M. et al. Prospective Multicenter Study of Children With Bronchiolitis Requiring Mechanical Ventilation. Pediatrics, v. 130, n. 3, p. e492 – e500, 2012. Disponível em: <http://ws003.juntadeandalucia.es:2524/content/130/3/e492.full>.

MANUKYAN, G. et al. Host immune Response to influenza A virus infection. Frontiers in Immunology, v. 9, n. 320, p. 1 – 13, Março 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5845129/pdf/fimmu-09-00320.pdf>. Acesso em: 2018-04-10.

MARGUET, C. et al. In Very Young Infants Severity of Acute Bronchiolitis Depends On Carried Viruses. PLoS ONE, v. 4, n. 2, p. e4596 –, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2644758/pdf/pone.0004596.pdf>. Acesso em: 2018-05-19.

MCNAMARA, P. S. et al. Pro-and anti-inflammatory responses in respiratory syncytial virus bronchiolitis. European Respiratory Journal, v. 23, n. 1, p. 106 – 112, 2004. Disponível em: <http://erj.ersjournals.com/content/erj/23/1/106.full.pdf>. Acesso em: 2018-05-19.

MEHTA, A. K. et al. Rhinovirus infection interferes with induction of tolerance to aeroantigens through OX40 ligand, thymic stromal lymphopoietin, and IL-33. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 137, n. 1, p. 278 – 288.e6, Janeiro 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674915007009>.

MEISSNER, H. C. Viral Bronchiolitis in Children. New England Journal of Medicine, v. 374, n. 1, p. 62 – 72, Janeiro 2016. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1413456>.

MEJIAS, A. et al. Whole Blood Gene Expression Profiles to Assess Pathogenesis and Disease Severity in Infants with Respiratory Syncytial Virus Infection. PLoS Medicine, v. 10, n. 11, p. 1 – 19, 2013.

MELLA, C. et al. Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. The Journal of infectious diseases, v. 207, n. 4, p. 564 – 573, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS - Sistema de Informações Hospitalares (SIH/SUS). 2017. Banco de dados do Sistema Único de Saúde. MORBIDADE HOSPITALAR DO SUS - POR LOCAL DE INTERNAÇÃO - BRASIL. Valor total segundo região. Capítulo CID-10: X. Doenças do aparelho respiratório. Lista de

Morbidades CID-10: Bronquite aguda e bronquiolite aguda. Período: 2017. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm>. Acesso em: 15/03/2018.

MITCHELL, I.; DEFOY, I.; GRUBB, E. Burden of Respiratory Syncytial Virus Hospitalizations in Canada. Infectious Diseases and Therapy, v. 6, n. 1, p. 37 – 56, 2017.

MORENO-SOLÍS, G. et al. Analysis of the local and systemic inflammatory response in hospitalized infants with respiratory syncitial virus bronchiolitis. Allergologia et Immunopathologia, v. 43, n. 3, p. 264 – 271, 5 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301054614000500>.

MUELLER, T.; JAFFE, A. S. Soluble ST2 - Analytical considerations. American Journal of Cardiology, v. 115, n. 7, p. 8B – 21B, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2015.01.035>.

NAIR, H. et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta- analysis. The Lancet, v. 375, n. 9725, p. 1545 – 1555, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60206-1>.

NASCIMENTO, M. S. et al. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. Clinics (São Paulo, Brazil), v. 65, n. 11, p. 1133 – 7, 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2999709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. Bronchiolitis: Diagnosis and Management of Bronchiolitis in Children. 1. ed. [S.l.], 2015. 1774 – 1793p. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2006-2223>. Acesso em: 15/03/2018.

NICHOLSON, E. G. et al. Robust Cytokine and Chemokine Response in Nasopharyngeal Secretions: Association With Decreased Severity in Children With Physician Diagnosed Bronchiolitis. Journal of Infectious Diseases, v. 214, n. 4, p. 649 – 655, 8 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/articlelookup/doi/10.1093/infdis/jiw191>.

PARK, J. et al. Comparison of nasal cytokine profiles of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. Asia Pacific Allergy, v. 77, n. 4, p. 206 – 212, 2017. Disponível em: <http://apallergy.org>. Acesso em: 2018-05-19.

POLLACK, M. Pediatric Risk of Mortality Score. Critical Care Medicine, v. 16, n. 11, p. 1110 – 1116, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3048900>.

PYLE, C. J. et al. Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology. PLoS

Pathogens, v. 13, n. 9, p. e1006640 –, September 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5633202/pdf/ppat.1006640.pdf>. Acesso em: 2018-05-19.

QI, F. et al. Macrophages produce IL-33 by activating MAPK signaling pathway during RSV infection. Molecular Immunology, v. 87, n. 77, p. 284 – 292, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.008>.

QI, F. et al. Respiratory macrophages and dendritic cells mediate respiratory syncytial virus-induced IL-33 production in TLR3- or TLR7-dependent manner. International Immunopharmacology, v. 29, n. 2, p. 408 – 415, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.10.022>.

QUEIROZ, G. A. et al. IL33 and L1RL1 variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population. International Journal of Immunogenetics, v. 44, n. 2, p. 51 – 61, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/iji.12306>. Acesso em: 2018-05-18.

RAIDEN, S. et al. Depletion of Circulating Regulatory T Cells during Severe Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 189, n. 7, p. 865 – 868, 4 2014. Disponível em: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201311-1977LE>.

REEVES, R. M. et al. Estimating the burden of respiratory syncytial virus (RSV) on respiratory hospital admissions in children less than five years of age in England, 2007-2012. Influenza and other Respiratory Viruses, v. 11, n. 2, p. 122 – 129, 2017.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, R. et al. Respiratory Syncytial Virus Genotypes, Host Immune Profiles, and Disease Severity in Young Children Hospitalized With Bronchiolitis. The Journal of Infectious Diseases, v. 217, n. 1, p. 24 – 34, 2017. Disponível em: <http://academic.oup.com/jid/article/217/1/24/4555346>.

ROSTAN, O. et al. Crucial and Diverse Role of the Interleukin-33/ST2 Axis in Infectious Diseases. Infection and Immunity, v. 83, n. 5, p. 1738 – 1748, 5 2015. Disponível em: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.02908-14>.

RUSSELL, C. D.; UNGER, S. A.; WALTON, M. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. Clinical Microbiology Reviews, v. 30, n. 2, p. 481 – 502, 4 2017. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5355638>. Acesso em: 2018-03-20.

SARAVIA, J. et al. Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age- Variable IL-33. PLoS Pathogens, v. 11, n. 10, p. 1 – 17, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005217>.

SCHELTEMA, N. M. et al. Global respiratory syncytial virus-associated mortality in young children (RSV GOLD): a retrospective case series. The Lancet Global Health, v. 5, n. 10, p. e984 – e991, 2017.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. Immunity, v. 23, n. 5, p. 479 – 490, 11 2005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761305003110>.

SHEIN, S. L. et al. Neurologic and Functional Morbidity in Critically Ill Children with Bronchiolitis. Pediatric Critical Care Medicine, v. 18, n. 12, p. 1106 – 1113, 2017.

SHI, T. et al. Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: Systematic review and meta-analysis. Journal of global health, v. 5, n. 2, p. 1 – 15, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26682048>.

SHI, T. et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. The Lancet, v. 390, n. 10098, p. 946 – 958, 2017.

SHI, T. et al. Aetiological role of common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years: A systematic review and meta-analysis. Journal of global health, v. 5, n. 1, p. 1 – 10, 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4593292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SILVA, E. R. da et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors. BMC Infectious Diseases, v. 13, n. 1, p. 41 –, 12 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/41://www.biomedcentral.com/info/authors/>.

SIMOES, E. A. F. et al. Challenges and Opportunities in Developing Respiratory Syncytial Virus Therapeutics. Journal of Infectious Diseases, v. 211, n. suppl 1, p. S1 – S20, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiu828>.

STEEN, O. V. de et al. The Burden of Severe Respiratory Syncytial Virus Disease Among Children Younger than 1 Year in Central and Eastern Europe. Infectious Diseases and Therapy, v. 5, n. 2, p. 125 – 37, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174177>.

STEIN, R. T. et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. Pediatric Pulmonology, v. 52, n. 4, p. 556 – 569, 2017.

STIER, M. T. et al. Respiratory syncytial virus infection activates IL-13-producing group 2 innate lymphoid cells through thymic stromal lymphopoietin. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 138, n. 3, p. 814 – 824.e11, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.01.050>.

SUN, Y.; LÓPEZ, C. B. The innate immune response to RSV: Advances in our

understanding of critical viral and host factors. Vaccine, p. 481 – 488, 2017.

SWINGLER, G. H.; HUSSEY, G. D.; ZWARENSTEIN, M. Duration of illness in ambulatory children diagnosed with bronchiolitis. Archives of pediatrics & adolescent medicine, v. 154, n. 10, p. 997 – 1000, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030851>.

TABARANI, C. M. et al. Novel Inflammatory Markers, Clinical Risk Factors, and Virus Type Associated with Severe Respiratory Syncytial Virus Infection. The Pediatric Infectious Disease Journal, v. 32, n. 12, p. e437 – e442, 12 2013. ISSN 0891-3668. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3883981/>.

TESHOME, G.; GATTU, R.; BROWN, R. Acute bronchiolitis. Pediatric Clinics of North America, v. 60, n. 5, p. 1020 – 1034, 2013.

THEOHARIDES, T. C. et al. Targeting IL-33 in Autoimmunity and Inflammation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 354, n. 1, p. 24 – 31, 7 2015. Disponível em: <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.114.222505>. Acesso em: 2018-04- 30.

TOURNIAIRE, G. et al. L'anémie, un nouveau facteur de sévérité de la bronchiolite aiguë du nourrisson ? Archives de Pédiatrie, v. 25, n. 3, p. 189 – 193, 4 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929693X18300435>. Acesso em: 2018-05-19.

TUNC, T. et al. Predictive value of soluble urokinase plasminogen activator receptor, soluble ST2 and IL-33 in bronchopulmonary dysplasia. Pediatric Research, v. 75, n. 6, p. 788 – 792, 6 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/pr201428>. Acesso em: 2018-05-18.

VANDINI, S. et al. Immune and inflammatory response in bronchiolitis due to respiratory Syncytial Virus and Rhinovirus infections in infants. Paediatric Respiratory Reviews, v. 24, p. 60 – 64, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2016.11.006>.

WALSH, E. E. et al. Severity of Respiratory Syncytial Virus Infection Is Related to Virus Strain. The Journal of infectious diseases, v. 175, p. 814 – 20, 1997.

WALZL, G. et al. Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. The Journal of experimental medicine, v. 193, n. 7, p. 785 – 92, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283151://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2193366>.

WELLIVER, T. P.; REED, J. L.; WELLIVER, R. C. Respiratory Syncytial Virus and Influenza Virus Infections. The Pediatric Infectious Disease Journal, v. 27, n. Supplement, S92 – S96, 10 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820587>.

WOLLMEISTER, E. et al. Respiratory syncytial virus in Brazilian infants – Ten

years, two cohorts. Journal of Clinical Virology, v. 98, n. November 2017, p. 33 – 36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.12.002>.

ZENG, S. et al. IL-33 Receptor (ST2) Signalling is Important for Regulation of Th2-Mediated Airway Inflammation in a Murine Model of Acute Respiratory Syncytial Virus Infection. Scandinavian Journal of Immunology, v. 81, n. 6, p. 494 – 501, 6 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/sji.12284>.

Apêndices

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa:

"Avaliação das concentrações séricas e em secreções respiratórias da interleucina 33 e do receptor ST2 solúvel em crianças com bronquiolite viral aguda e sua associação com a gravidade da doença"

Pesquisadora responsável: Carolina Augusta Arantes Portugal – Médica pediatra intensivista, pós-graduanda no Departamento de Puericultura e Pediatria.

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Ana Paula de Carvalho Panzeri Carlotti – Docente responsável pelo CTI-Pediátrico do HCFMRP-USP.

Prezado senhor(a),

O(a) seu(sua) filho(a)_____ está sendo convidado(a) a participar de um estudo clínico. Antes de decidir se o(a) senhor(a) autoriza a participação dele(a), é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos.

Por favor, leia atentamente todas as informações fornecidas e faça perguntas ao seu médico se tiver qualquer dúvida.

QUAL O OBJETIVO DESTE ESTUDO?

A bronquiolite é uma doença que afeta os pulmões de crianças abaixo dos 5 anos, e, em algumas delas, pode levar a falência respiratória e necessidade de ventilação mecânica. O objetivo deste estudo é avaliar possíveis exames laboratoriais complementares que indiquem quais crianças podem evoluir com falência respiratória.

COMO VAI SER O ESTUDO?

Todas as crianças que necessitam admissão na enfermaria ou na UTI são submetidas a exames de sangue durante a internação. As crianças com bronquiolite nas suas formas mais graves e que tem indicação de internação também são submetidas a um exame da secreção nasal para identificação do vírus responsável pela doença. Serão colhidos 5 ml de sangue além dos exames de rotina para verificarmos o valor das Interleucinas 1ß, 4, 6, 8, 33, TNF-alfa e receptor ST-2 solúvel. As mesmas substâncias serão medidas na secreção nasal da criança, no momento da primeira coleta para identificação do vírus e no quinto dia de internação. Se a criança estiver intubada, será colhida também secreção pelo tubo traqueal.

QUAIS OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS E RISCOS?

A coleta do sangue será junto com a coleta necessária para o diagnóstico e tratamento da criança no hospital, podendo também ser colhido o sangue de veias que já estão com cateteres (aqueles caninhos por onde correm o soro e os remédios) e a secreção nasal e do tubo traqueal serão colhidas por uma sonda, num procedimento indolor, porém que pode provocar tosse e sensação de náusea na criança.

PRECISO PARTICIPAR?

A participação do seu(sua) filho(a) no estudo não é obrigatória. Se decidir participar, o senhor deverá assinar este documento, chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Se não for participar do estudo, é importante que saiba que isso não afetará em nada o atendimento prestado ao seu (sua) filho(a) que continuará recebendo o melhor tratamento que este hospital pode oferecer. Mas mesmo se decidir participar, poderá desistir a qualquer momento, sem prejuízo ao tratamento da criança.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS?

Este estudo contribui para um melhor entendimento da falência respiratória causada pela bronquiolite em crianças que internam no hospital e na UTI e pode ajudar na avaliação de marcadores promissores de falência respiratória, mais sensível e fidedigno do que os que dispomos atualmente. O entendimento melhor desta doença permitirá ao médico medidas de estabilização precoces nas crianças com bronquiolite, podendo até mesmo, no futuro, vir a evitar sua evolução para estágios mais graves de falência respiratória.

HAVERÁ ALGUMA REMUNERAÇÃO?

NÃO será oferecida nenhuma remuneração em dinheiro para os participantes da pesquisa.

AS INFORMAÇÕES SERÃO CONFIDENCIAIS?

As informações colhidas sobre as condições de saúde do seu filho serão arquivadas e utilizadas para fazer o estudo, mas em momento nenhum o nome da criança será divulgado. O resultado deste estudo poderá ser publicado em revistas médicas nacionais ou internacionais. Reforço que a identidade do seu filho será sempre preservada. Se o(a) senhor(a) tiver alguma dúvida durante o estudo ou quiser sair do estudo a qualquer momento, poderá ligar diretamente para a pesquisadora pelo telefone: 0xx16 3602-1215.

Eu,_____, ( )mãe, ( ) pai, ou ( ) responsável legal pelo menor _____declaro que li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre a participação de minha criança no presente estudo e tive a oportunidade de discutir e tirar minhas dúvidas. Todas as minhas perguntas foram satisfatoriamente respondidas e concordo voluntariamente que meu (minha) filho(a) participe do estudo. Entendo que receberei uma cópia

deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Autorizo também a divulgação dos resultados do estudo em revistas médicas nacionais e/ou internacionais. Entendi que todas as informações serão colhidas e processadas de maneira confidencial.

Assinatura do responsável legal:

_____

Assinatura do pesquisador:

_____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

APÊNDICE B – FICHA DE LEVANTAMENTO

Protocolo de Pesquisa
(0) Enfermaria (1) UTI (2) Enfermaria+ UTI

Tabela 18 - Dados demográficos e fatores de risco

Nome	
Registro	
Data de nascimento	
Sexo	(0) Masculino (1) Feminino
Peso	_____ g
Data da internação hospitalar	
Data da alta hospitalar	
Antecedente de prematuridade	(0) Sim (1) Não (2) não consta Idade gestacional:__(semanas + dias)

Palivizumab	(0) Sim (1) Não
Displasia Broncopulmonar	(0) Sim (1) Não
Cardiopatia congênita	(0) Sim (1) Não
Neuropatia	(0) Sim (1) Não
Imunossupressão	(0) Sim (1) Não
História prévia de sibilância	(0) Sim (1) Não
Presença de contactantes doentes	(0) Sim (1) Não
História familiar de asma	(0) Sim (1) Não
Desfecho Causa Mortis	Óbito (0) Sim (1) Não (999) não se aplica

Tabela 19 - Dados clínicos

Duração dos sintomas antes da internação	_____dias
Escore de gravidade:	
Frequência respiratória	

0-12 meses de idade leve – 1 ponto moderada – 2 pontos grave – 3 pontos	≤ 64/min – leve (0) 65 - 70/min – moderada (1) > 70/min – grave (2) (3) não consta (999) não se aplica
Frequência respiratória	
Secreção em via aérea leve – 1 ponto moderada – 2 pontos grave – 3 pontos	Rinorréia (0) Tosse frequente/engasgos/secreção em excesso (1) Inabilidade de mobilizar secreção (2) (3) não consta
Frequência respiratória	
Uso de ß2-agonista	(0) Sim (1) Não
Uso de corticoide sistêmico nas últimas 24 horas?	(0) Sim (1) Não
Uso de corticoide sistêmico por período superior a 5 dias?	(0) Sim (1) Não
Imunocromatografia para VSR	(0) Sim (1) Não

Positivo para VSR	(0) Sim (1) Não
Identificados outros vírus	(0) Sim (1) Não
Frequência respiratória	
Radiografia de tórax	(0) Sim (1) Não
Atelectasia ao Rx	(0) Sim (1) Não (999) não se aplica
Hipodensidade alveolar ao Rx	(0) Sim (1) Não (999) não se aplica
Diagnóstico de pneumonia	(0) Sim (1) Não
Tratamento com antimicrobiano	(0) Sim (1) Não
VSR nosocomial	(0) Sim (1) Não
Necessidade de UTI	(0) Sim (1) Não

Tabela 20 - Dados de terapia intensiva

Indicação de UTI	1 Piora desconforto respiratório 2 Sinais de sepse grave 3 Letargia 4 Hipoxemia mantida com FiO2 > 40% 5 Acidose respiratória/$PaCO_2$> 60mmHg 6 Outros:__ (999) Não se aplica
Data da internação na UTI	(999) Não se aplica
Frequência respiratória	
Frequência respiratória	
Agente isolado	(999) Não se aplica
PIM admissão	(999) Não se aplica
PRISM III	(999) Não se aplica

Legenda: PIM, Pediatric Index of Mortality; PRISM III, Pediatric Risk of Mortality

APÊNDICE C – CURVAS ROC

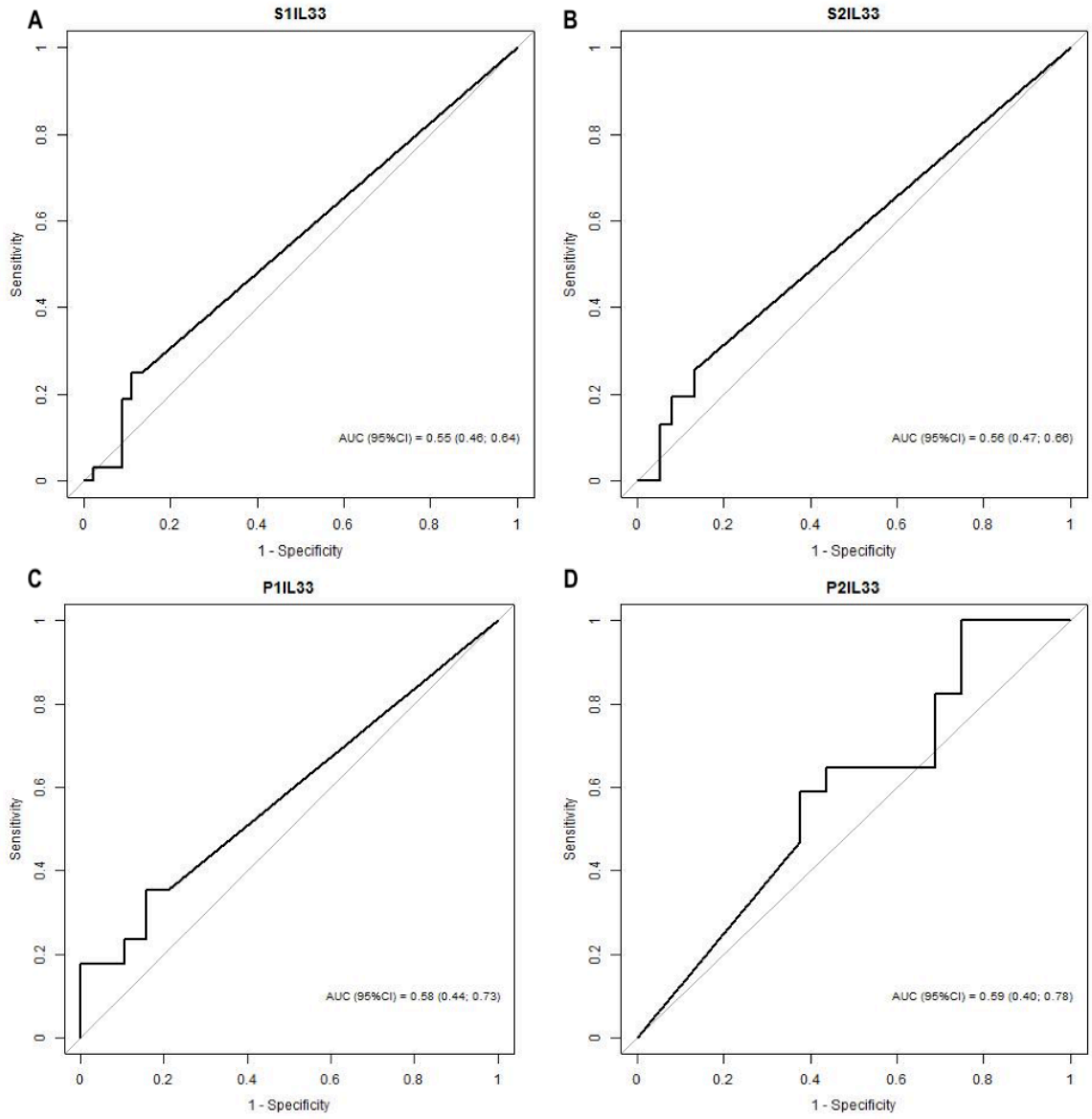


Figura 4 - Curvas ROC da concentração de IL-33 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica.

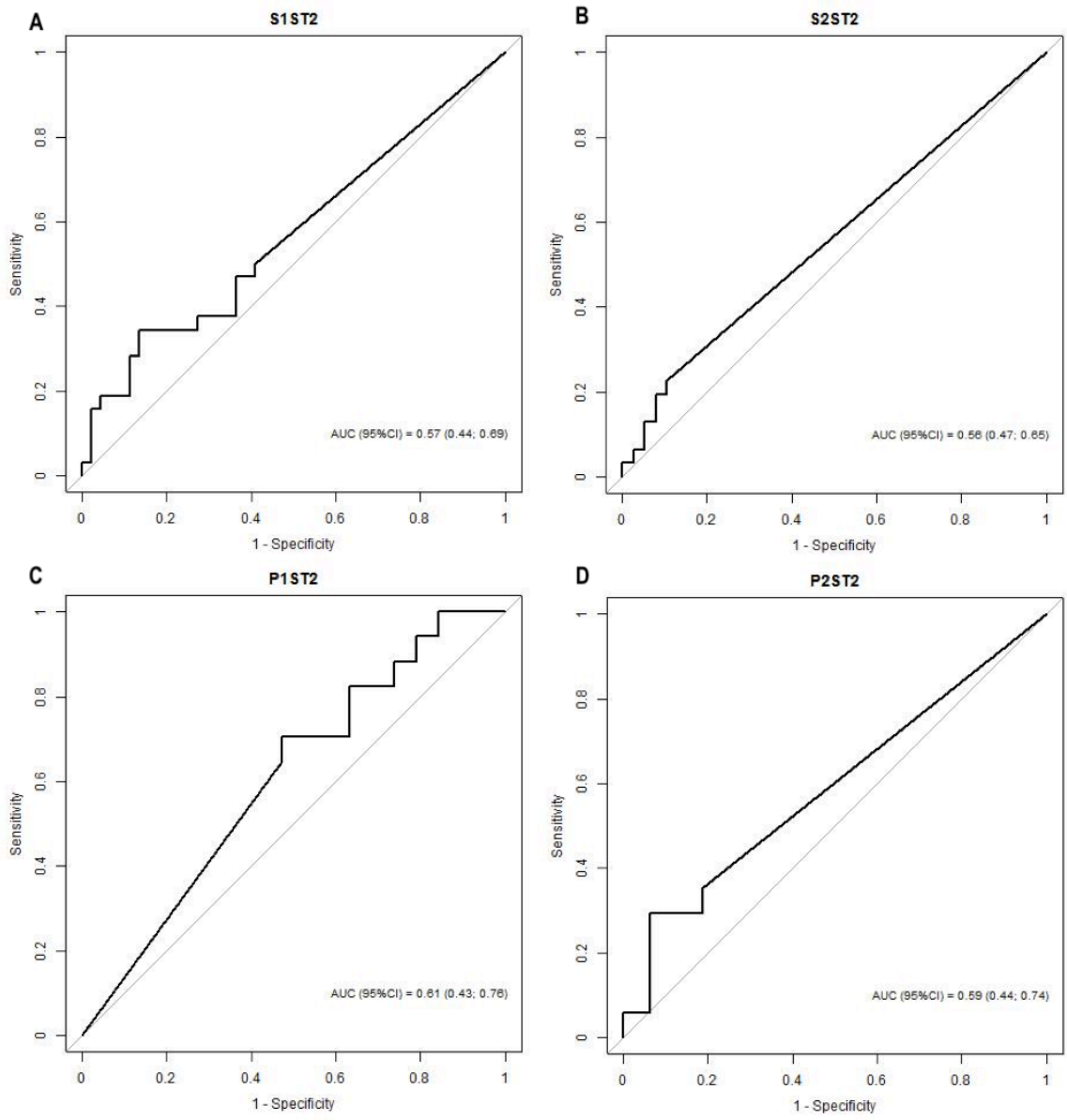


Figura 5 – Curvas ROC da concentração de sST2 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica.

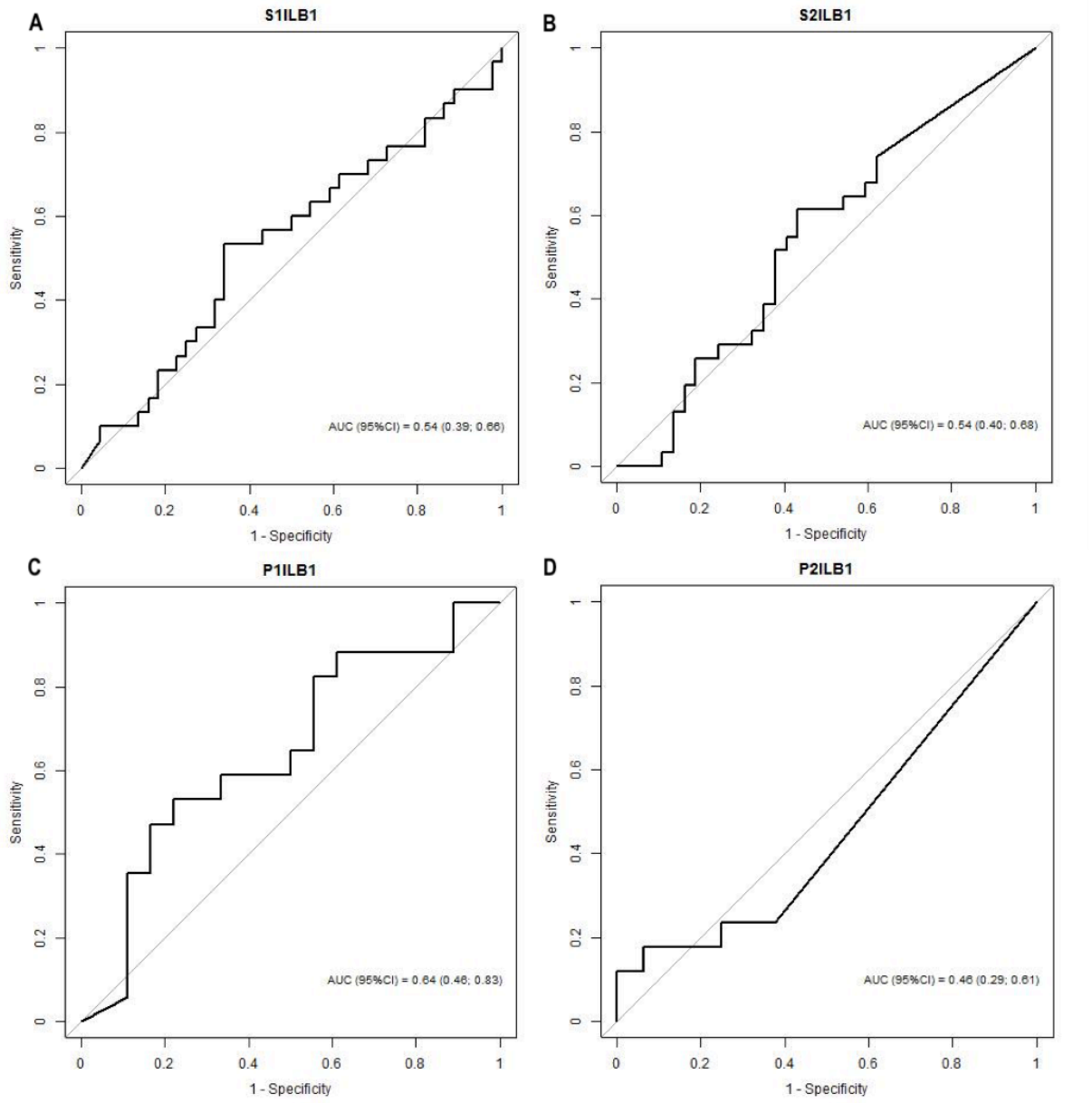


Figura 6 – Curvas ROC da concentração de IL-1ß em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica.

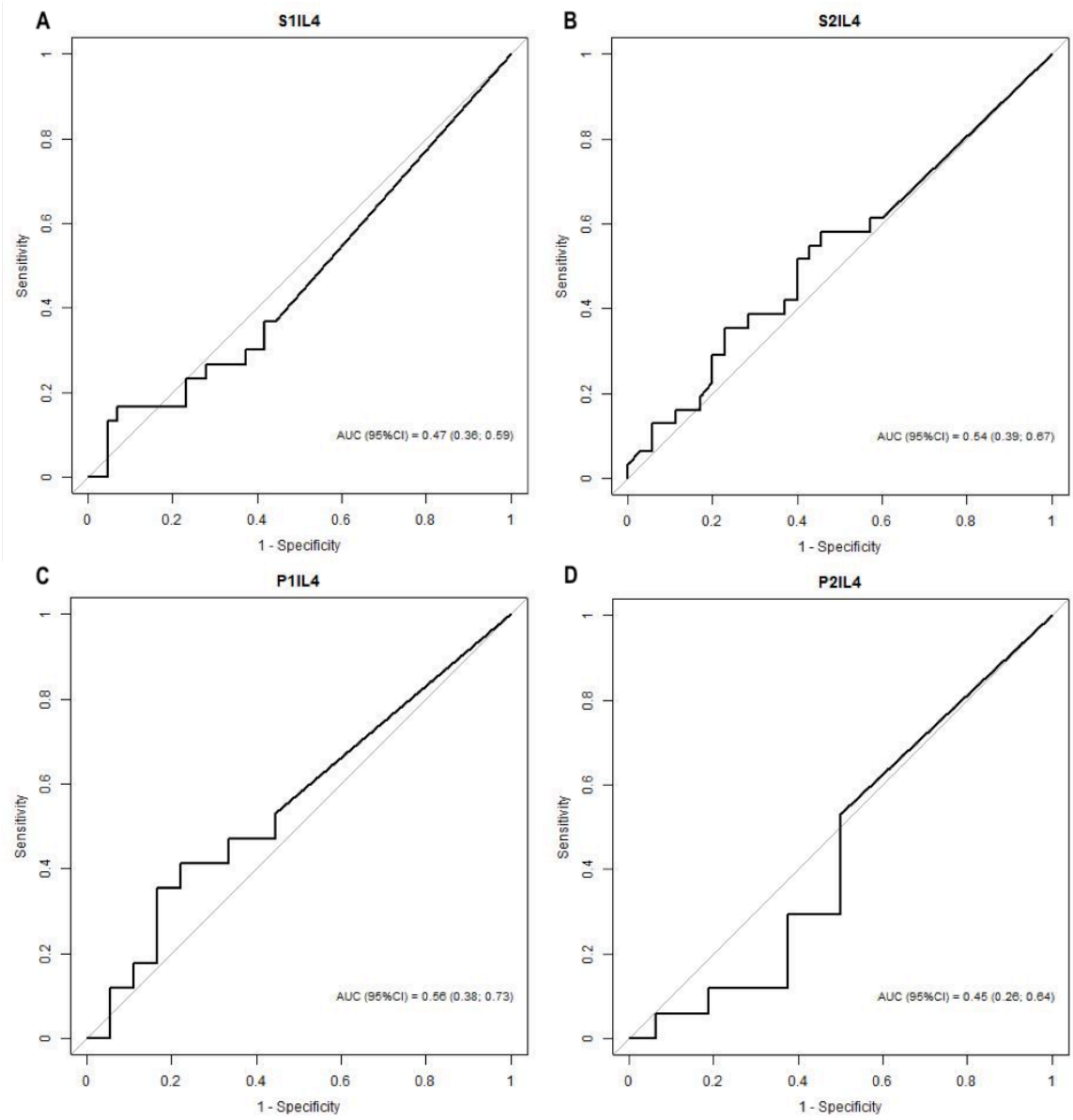


Figura 7 – Curvas ROC da concentração de IL-4 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica.

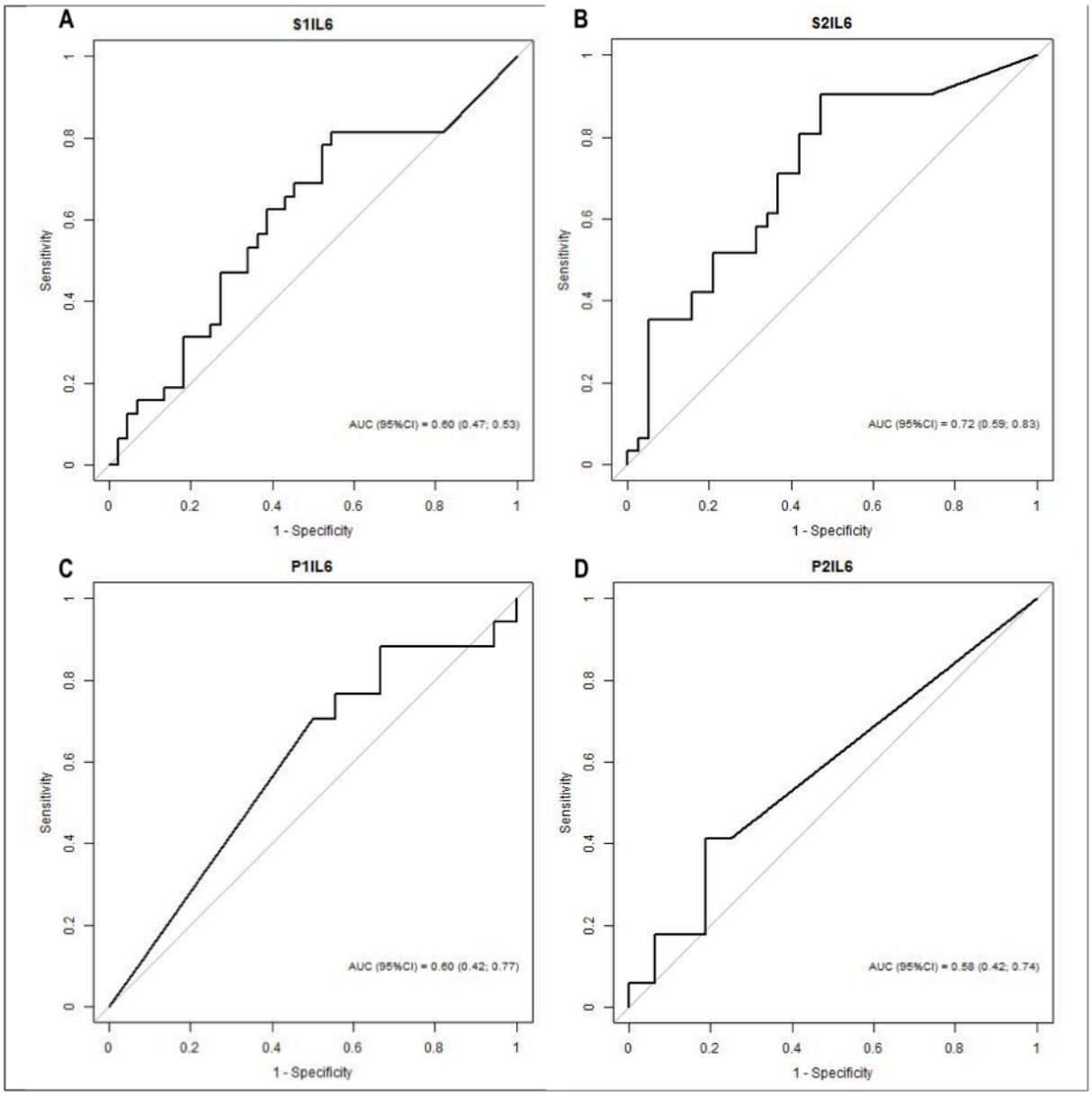


Figura 8 – Curvas ROC da concentração de IL-6 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica.

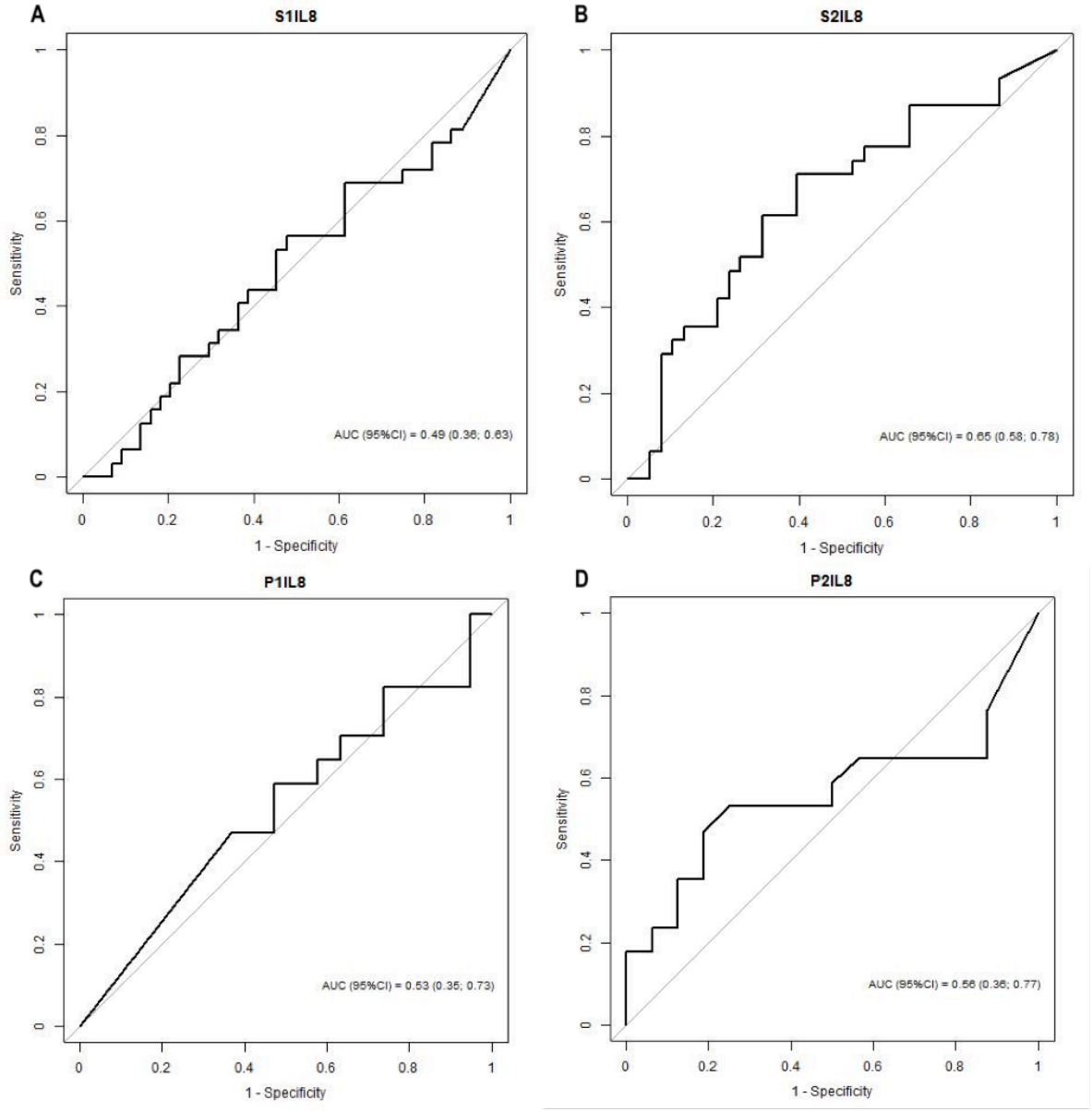


Figura 9 - Curvas ROC da concentração de IL-8 em secreção nasofaríngea (A e B) e plasma (C e D) de pacientes com bronquiolite viral aguda durante o primeiro (A e C) e quinto dia (B e D) de internação hospitalar para predição de necessidade de ventilação mecânica.

Anexos

ANEXO A – Protocolo de processamento das amostras clínicas para realização de RT-qPCR

Processamento da amostra clínica

1. Colocar a amostra contida no equipo em um tubo de 15ml estéril e completar 3ml com PBS.
2. Se houver muito muco, acrescentar N-acetilcisteína (no máximo 1ml; Sigma) aos poucos até ficar mais fluída.
3. Fazer duas alíquotas:

- 250µl + 750µl TRIzol®, em um tubo de 1mL - amostra para uso de técnicas moleculares
- 500µl + 500µl Meio de Congelamento – alíquota backup

4. Armazenar à -70^{o}C.

- PBS é uma solução salina tamponada com fosfato.

- TRIzol® Reagente é solução monofásica de fenol e isotiocianeto de guanidina.

Meio de Congelamento de vírus: 20% de SBF

15% de Glicerol

1% de antibiótico-antimicótico

Completar com MEM

Extração de Ácido Nucléico Total em amostras em TRizol® (Invitrogen – protocolo adaptado por Talita B. Gagliardi)

Antes de Começar

- No tubo contendo a amostra deve conter: 750ul de Trizol (ou Brazol) + 250ul de amostra.

Extração de RNA

1. Incubar o tubo durante 5 min a temperatura ambiente.
2. Adicionar 150ul de Clorofórmio e homogeneizar em vortex por 15 seg.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 3min.
4. Centrifugar a 12000 x g por 15min a 4ºC.
5. Haverá separação de 2 fases: a inferior (rosa ou azul) contém o Fenol-Clorofórmio; a superior (incolor) contém o RNA; as proteínas e DNA ficam na interfase.
6. Usando a pipeta, transferir a fase incolor para os tubos previamente identificados, tomando muito cuidado para não pegar a interfase ou a fase inferior. Se for fazer extração de DNA, transferir a interfase para um tubo separado.

Precipitação de RNA

Precipitação

7. Adicionar 375ul de Isopropanol 100% gelado.
8. Homogeneizar em vortex.
9. Incubar 1h a 4ºC e protegido da luz.
10. Centrifugar a 12000 x g por 30min a 4ºC.
11. Descartar o sobrenadante.

Lavagem

12. Acrescentar 750ul de Etanol 75% gelado.
13. Homegeneizar em vortex.
14. Centrifugar a 7500 x g por 5 min a 4ºC
15. Descartar o sobrenadante e deixar os tubos com a tampa aberta ou de ponta cabeça dentro de um fluxo laminar ou em um banho seco a 5quintoC.
16. Preparar o Mix para RT.
17. Ressuspender a pellet com 30ul de H_2O DEPEC ou H_2O da Gibco.
18. Incubar 10 min a 55-60ºC.
19. Armazenar em freezer a -70ºC.

Extração de DNA

1. Utilizar a fração intérfase, que contém proteínas e DNA.

Precipitação de DNA

Precipitação

2. Adicionar 200ul de Etanol 100% gelado.
3. Homogeneizar em vortex.
4. Incubar 3min a r.t.
5. Centrifugar a 2000 x g por 5min a 4ºC.
6. Descartar o sobrenadante.

Lavagem

7. Adicionar 800ul da solução de lavagem gelada (0,1M citrato de sódio + 10% etanol).
8. Homegeneizar em vortex.
9. Incubar 30min a r.t.
10. Centrifugar a 2000 x g por 5 min a 4ºC
11. Descartar o sobrenadante.
12. Lavar mais 2 vezes.
13. Adicionar 800ul etanol 100% gelado.
14. Homegeneizar em vortex.
15. Incubar 20min a r.t.
16. Centrifugar a 2000 x g por 5 min a 4ºC.
17. Descartar o sobrenadante.
18. Ressuspender a pellet com 50ul de H_2O DEPEC ou H_2O da Gibco.
19. Incubar 10 min a 55-60ºC.
20. Armazenar em freezer a -20ºC.

RT-PCR ("High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit", Applied Biosystem)

A) Pré-RT

Processo inicial da reação.

1. Num eppendorf colocar:

- 1µg de RNA (amostra extraída) – OBS: para esta o máximo é 2ug de RNA!!
- **2µL de Random Hexâmero Primer (0,5µg) ou oligo (dT), ou 20pmol de primer específico.**
- H_2O Milli-Q Autoclavada até completar o volume de 12ul.

2. Homogeneizar.
3. Levar ao termociclador:

- 95^oC - 5 minutos
- 4^oC - 5 minutos

B) RT-PCR

1. Acrescentar em cada amostra pós Pré-RT o seguinte mix (total 8ul):

- 4,2ul de H_2O Milli-Q Autoclavada
- 2ul de Buffer 5x
- 0,8ul de dNTP 10mM mix
- 1ul de Reverse Transcriptase

2. Homogeneizar e centrifugar (só um spin).
3. Levar ao termociclador:

- 25^oC - 10 minutos
- 37^oC - 120 minutos
- 85^oC - 5 minutos.

PCR (“Phusion™ High Fidelity DNA Polimerase”, Finnzymes)

1. Num eppendorf acrescentar 5µl de cDNA da amostra desejada e o seguinte mix (volume total de 45µL / 20µL):

- 30µL / 10,8µL de H_2O Milli-Q Autoclavada
- 10µL / 4µL de Buffer HF 5x *

- 1,5µL / 0,6µL de DMSO **
- 1µL / 0,4µL de dNTP 10mM
- 1µL / 0,5µL de Primer Foward 10pmoles
- 1µL / 0,5µL de Primer Reverse 10pmoles
- 0,5µL / 0,2µL de DNA polimerase (2,5u / 1u)

2. Vortexar e centrifugar (só um spin).
3. Levar ao termociclador utilizando as seguintes condições:

- 98^{o}C - 30 segundos
- 35 ciclos: 98^{o}C - 10 segundos

T anelamento - 30 segundos

72^{o}C - 30 segundos / 1Kb

- 72^{o}C - 10 minutos
- 10^{o}C -

PCR para detectar HRV (Protocolo Wai-Ming Lee)Primers:

Forward primer:
BF1 = mixture of 25 uM of B1, B2 and B3:
HRV-B1 CAAGCACTTCTGTTTCCCC 51,50,56 P1-1
HRV-B2 CAAGCACTTCTGTTACCCC 51,50,55 P1-1
HRV-B3 CAAGCACTTCTGTCTCCCC 53,52,57 P1-1

Reverse primer:
FR2: ACGGACACCCAAAGTAG 47,46,53 P3-1

I) PCR – reação 1

1. Prepare o mix abaixo:
12 ul Platinum PCR SuperMix HF (Invitrogen 12532-016)

0,25 ul primer BF1 (25mM)

0,25 ul primer FR2 (25mM)
2,5 ul cDNA randômico

2. Programa “HRVTOUCH-DOWN”
1. 94C 2 min
2. 94C 20 sec
3. 68C 30 sec
4. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
5. Go to 2, 2 times

6. 94C 20 sec
7. 66C 30 sec
8. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
9. Go to 6, 2 times

10. 94C 20 sec
11. 64C 30 sec
12. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
13. Go to 10, 2 times

14. 94C 20 sec
15. 62C 30 sec
16. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
17. Go to 14, 2 times

18. 94C 20 sec
19. 60C 30 sec
20. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
21. Go to 18, 2 times

22. 94C 20 sec

23. 58C 30 sec
24. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
25. Go to 22, 2 times

26. 94C 20 sec
27. 56C 30 sec
28. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
29. Go to 26, 2 times

30. 94C 20 sec
31. 54C 30 sec
32. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
33. Go to 30, 2 times

34. 94C 20 sec
35. 52C 30 sec
36. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
37. Goto 34, 11 time
38. 68C 10 min
39. 4C forever.

II) PCR – reação 2

3. Prepare o mix abaixo:
22,5 ul Platinum PCR SuperMix HF (Invitrogen 12532-016)

0,5ul primer BF1 (25mM)

0,5ul primer FR2 (25mM)
2,5 ul produto de PCR da reação 1 (acima)

4. Programa “HRV 2-PCR”

1. 94C 2 min
2. 94C 20 sec
3. 52C 30 sec

4. 68C 40 sec (1 min for 1 Kb fragment)
5. repeat steps 2-4 for 27 times
6. 68C 3 min
7. 4C forever

III) PCR – purificação + sequenciamento

5. Adicione 2 ul de Exo-SAP-IT (USBiochemicals; USB; cat. # 70995) em 5ul do produto da segunda PCR.

6. Exo-SAP-IT: USBiochemicals (USB) cat. # 70995, 100 reactions.
7. Incube:

37ºC – 25min

90ºC – 15min
8. Use 3uL do produto na reação de seqüenciamento com o primer FR2.

EXO-SAP-IT treatment of PCR product for Sequencing (Exo-SAP-IT: USBiochemicals (USB) cat. # 70995, 100 reactions)

1. Add 2ul of Exo-SAP-IT into 5ul of PCR product.
2. Incubate 37^{o}C for 25 min and then 90^{o}C for 15 min.
3. Store the EXO-SAP product at -20^{o}C until set up of sequencing reaction.

Concentrar Amostra

1. Colocar o eppendorf com a amostra dentro do aparelho “Speed Vack”, estando o tubo com a tampa aberta.

2. Selecionar a velocidade (de preferência “média”).

3. Iniciar “Concentração”.

Obs: manter um volume de aproximadamente 12µl, essencial para quantificar (2µl) e para seqüenciar (9 a 10µl). Se não conter o volume final desejado, diluir amostra já concentrada em H_2O Milli-Q Autoclavada e quente (melhor dissolução) na quantidade desejada, antes do uso.

Quantificar no Espectrofotômetro

1. Selecionar o tipo de amostra – por causa da absorbância (Abs).

2. Indicar a diluição (diluir a amostra em H_2O Milli-Q).

3. Ler o Branco (eluato) primeiramente.

4. Ler as amostras.

-
- Ligar o aparelho 5 minutos antes de usar.
- Usar no mínimo 50ml da diluição.
- Usar cubeta específica ao tipo de amostra (ex: Oligo, DNA, RNA).
- Toda vez que colocar uma amostra, lavar bem a cubeta com H_2O Milli-Q.
- Usar H_2O Milli-Q como branco.
- Para melhor medição fazer sempre em triplicata.

Quantificar Ácido Nucléico no Espectrofotômetro

- Usa Abs de 260nm.
- 1u DO (densidade óptica) = 40ng de **RNA** ou 50 ng de DNA /uL
- $\mathbf{A_{260/280}}$ - avaliar a contaminação por proteínas; amostra livre de proteínas = 2.0
- $\mathbf{A_{260/230}}$ - avaliar a contaminação por polissacarídeos e compostos orgânicos (ex. fenol); amostra livre = 2.0
- $\mathbf{A_{260/320}}$ - avaliar a contaminação por outros compostos (background); amostra livre = 2.0

Reação de Marcação Fluorescente (II)

1. Em um eppendorf colocar:

4µL de Tampão

1,6µL de Primer Foward ou Reverse 10pM

xng de produto de PCR purificado ou 250ng de clone purificado

2µl de Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Standart

H_2O (completar volume para 20µL)

2. Homogeneizar e centrifugar (só um spin).
3. Levar no termociclador:

- 40 ciclos: 96^oC - 10 segundos

50^oC - 15 segundos

60^oC - 4 minutos

- 4^oC - ∞

Obs: para reação em placa de 96 cavidades:

- Somente fazer em placa se ocupá-la mais da metade.
- Preencher a placa por coluna ao invés de linha.
- Utilizar a pipeta multicanal quando puder para facilitar.
- Tampar a placa com as tampas próprias.

PCR em tempo real (Taqman) - detecção de vírus respiratório (tabela {tab:f67fd})

1) RNase P

5µL de TaqMan Mix

0,5µL de Primer Foward (10pM)

0.5µL de Primer Reverse (10pM)

0,5µL de sonda (10pM)

0,5µL H_2O ultrapura

1µL de cDNA

2) Adenovírus

5µL de TaqMan Mix

0,25µL de Primer Foward (10pM)

0.25µL de Primer Reverse (10pM)

0,125µL de sonda (10pM)

1,375µL H_2O ultrapura

1µL de cDNA

3) HRV

7,5µL de TaqMan Mix

0,5µL de Primer Foward (10pM)

0.5µL de Primer Reverse (10pM)

0,25µL de sonda 1 (10pM)

0,25µL de sonda 2 (10pM)

3µL H_2O ultrapura

1µL de cDNA

4) HRSV A e B

7,5µL de TaqMan Mix

0,5µL de Primer Foward A (10pM)

0.5µL de Primer Reverse A (10pM)

0,5µL de Primer Foward B (10pM)

0.5µL de Primer Reverse B (10pM)

0,25µL de sonda A (10pM)

0,25µL de sonda B (10pM)

2µL H_2O ultrapura

1µL de cDNA

5) HMPV A e B

7,5µL de TaqMan Mix

0,5µL de Primer Foward A (10pM)

0.5µL de Primer Reverse A (10pM)

0,5µL de Primer Foward B (10pM)

0.5µL de Primer Reverse B (10pM)

0,25µL de sonda A (10pM)

0,25µL de sonda B (10pM)

2µL H_2O ultrapura

1µL de cDNA

6) Flu A e B

5µL de TaqMan Mix

0,5µL de Primer Foward (10pM)

0.5µL de Primer Reverse (10pM)

0,25µL de sonda (10pM)

0,75µL H_2O ultrapura

1µL de cDNA

Tabela 21 - Painel de ensaio de qPCR para cada vírus

Vírus/Controle endógeno	**Primer**	**Sequência 5'-3'**	**Referências**
HRSVA	Forward	GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	(1)
	reverse	TGCTCCGTTGCATGGTGTATT	
	probe	FAM/ACACTCAACAAAGATCAACTTCTGTC/TAMRA	
HRSV B	Forward	GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAA	(1)
	reverse	TGTCAATATTATCTCCTGTACTACGTTGAA	
	probe	HEX/TGATACATTAAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCCA/TAMRA	
FLUA	Forward	GACCRATCCTGTCACCTCTGAC	(2)
	Reverse	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA	
	Probe	FAM/TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG/IBFQ	
RNAse P	Forward	AGATTTGGACCTGCGAGCG	(2)
	Reverse	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
	probe	FAM/TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG/IBFQ	
FLUB	Forward	AAATACGGTGGATTAAATAAAAGCAA	(3)
	reverse	CCAGCAATAGCTCCGAAGAAA	
	probe	HEX/CACCCATATTGGGCAATTTCCTATGGC/TAMRA	
HRV	Forward	ACM GTG TYC TAG CCT GCG TGG C	(4)
	Reverse	GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA GT	
	Probe 1	FAM / TCC TCC GGC CCC TGA AT / IBFQ	
	HMPVA for	GCCGTTAGCTTCAGTCAATTCAA	
	HMPVA rev	TCCAGCATTGTCTGAAAATTGC	

Vírus/Controle endógeno	Primer	Sequência 5'-3'	Referências
HMPV	Probe A	FAM/CAACATTTAGAAACCTTCT/MGB	
	HMPVB for	GCTGTCAGCTTCAGTCAATTCAA	(5)
	HMPVB rev	GTTATCCCTGCATTGTCTGAAAACT	
	Probe B	FAM/CGCACAACATTTAGGAATCTTCT/MGB	
HAdV	Forward	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	(6)
	Reverse	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC	
	Probe	FAM/TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA/TAMRA	

(1). Hu A, Colella M, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM (2003) Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. J Clin Microbiol 41: 149-154. (2). CDC (2009) Protocol of real time RT-PCR for influenza A. Available: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html. (3). Van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM (2001) Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. J Clin Microbiol 39: 196-200. (4). Deffernez C, Wunderli W, Thomas Y, Yerly S, Perrin L, et al. (2004) Amplicon sequencing and improved detection of human rhinovirus in respiratory samples. J Clin Microbiol 42: 3212-3218. (5). Kuypers J, Wright N, Corey L, Morrow R: Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology 2005, 33(4):299-305. (6). Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. J Med Virol 70: 228-239.

Clonagem – Sistema "pGEM-T Easy" (Promega)

Ligação Inserto - Vetor

1. Num tubo adicionar:

Y*** ng do produto de PCR purificado (feito com TAQ Recombinante – adição de "A" terminal)

1µL do vetor pGEM-T Easy Vector (50ng/µL)

5µL de 2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase

1µL de T4 DNA Ligase (3 unidades de Weiss/µL)

completar com H_2O Milli-Q Autoclavada (volume final = 10µL)

CONTROLE NEGATIVO: sem produto de PCR

CONTROLE POSITIVO: DNA inserto controle – adicionar 2µL/reação

2. Misturar gentilmente.
3. Incubar overnight a 4^{o}C.

Passos seguintes:

- Eletroporar.
- Plaquear as bactérias em placas contendo ampicilina (50ng), X-GAL (40µ) e IPTG (20µL).

Obs: colocar tanto o IPTG quanto o X-GAL 30 minutos antes de plaquear as bactérias.

Obs_2: colônia de interesse = colônias brancas

- Fazer o miniprep.
- Fazer PCR com primers M13.
- Digerir com enzimas de restrição para linearizar o plasmídeo e verificar em gel de agarose 2%.

Transcrição in vitro com enzima T7 polimerase

“T7 RNA polimerase DNA dependente” (Epicentre Biotechnology)

(protocolo de Wai-Ming Lee)

- Transcrição in vitro com enzima T7 é 100x mais eficiente do que com a enzima T3.
- Enzima T7 da Biolab é ruim!! Melhores são Invitrogen, Epicentre.
- Utilizar ambiente e cuba de eletroforese livre de RNAse.
- **Protocolo para descontaminar**: incubar o ambiente/cuba por 1h com a solução de descontaminação pré-aquecida a 80°C; em seguida remover esta com água DEPC.
- **Solução para descontaminação com RNAse**: água DEPC + 0,4% EDTA + 0,2% SDS.

1. Fazer miniprep da cultura que contém o plasmídeo de interesse.

- WML: miniprep com o kit da Qiagen, seguido de purificação pelo método de fenol/clorofórmio/etanol para remover todas nucleases presentes.

2. Quantificar em A_{260nm}.
3. Linearizar 20µg do plasmídeo de interesse.

- HRV-14 (pWR3.26): MluI
- HRV-16 (p16.11): SacI

4. Adicionar num tubo de 0,5mL o seguinte mix (total = 250µL):

- 4µg DNA linearizado
- 50µL de tampão da enzima T7 5x
- 25µL NTP 5mM
- 5µL DTT 0,5M
- 200u inibidor de RNAse
- q.s.q 250µL água ultra pura

5. Homogeneizar vigorosamente (usar vórtex).
6. Incubar o tubo no termociclador: 37^{o}C – 15 minutos.
7. Adicionar 25u da enzima T7 polimerase.

8. Homogeneizar vigorosamente (usar vórtex).
9. Incubar o tubo no termociclador: 37^{o}C – 60 minutos.
10. Transferir o tubo imediatamente para o gelo (inativar a enzima).
11. Aplicar 2µL do produto em gel de agarose a 0,8%, com os cuidados de evitar contamninção com RNAse.

- Ausência de degradação: prosseguir.
- Presença de degradação: repetir transcrição

12. Armazenar os transcritos a -70^{o}C.