

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA/PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA**

MAGÁLI MOCELLIN

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs2275913 DE *IL-17* E A
GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE AGUDA EM LACTENTES**

**PORTO ALEGRE
2014**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL – PUCRS

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs2275913 DE *IL-17* E A
GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE AGUDA EM LACTENTES**

MAGÁLI MOCELLIN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina /Pediatría e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Duarte de Souza

Porto Alegre, 2014.

DADOS DE CATALOGAÇÃO

M688a Mocellin, Magáli

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs2275913 DE *IL-17* E A GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE AGUDA EM LACTENTES/ **Magáli Mocellin**.
Porto Alegre: PUCRS, 2014.

059 f.: il.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Duarte de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança.

1. BRONQUIOLITE. 2. POLIMORFISMO. 3. INTERLEUCINA-17.
4. SIBILÂNCIA. 5. ESTUDO DE CASO-CONTROLE. I. Pinto, Leonardo Araújo. II. Souza, Ana Paula Duarte de. III. Título.

CDD 618.9223

CDU 616.233-053.3(043.3)

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Caetano Mocellin (in memoriam) e Realda Ignez Bonatto Mocellin, pela
vida.*

*Ao meu esposo Paulo Renato, aos meus filhos Fernando e Henrique, meu
agradecimento pelo amor e apoio em todos os momentos.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À colega e amiga Lidiane Alves de Azeredo Leitão, companheira de bancada,
constante incentivadora na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o curso.

Ao Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS.

Aos pacientes e seus responsáveis, por aceitarem participar deste estudo e desta forma contribuir para o campo da pesquisa.

Ao professor e orientador Dr. Leonardo Araújo Pinto, minha admiração por seu conhecimento e sua dedicação à pesquisa. Meu agradecimento por ter acreditado no meu potencial e por ter me proporcionado aprendizado científico ao seu lado e dos demais pesquisadores do laboratório de Imunologia Clínica e Experimental do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS.

À professora e coorientadora Dra. Ana Paula Duarte de Souza, pelo seu imenso conhecimento de Imunologia, por sua dedicação e empenho.

À professora Dra. Bárbara Nery Porto, por seu conhecimento, sua amizade.

À professora Dra. Rita Mattiello, por seu conhecimento, sua amizade e incentivos.

À professora Dra. Florencia M. Barbé-Tuana, pela oportunidade de conhecê-la e poder participar do universo de seu laboratório. Muito obrigada pela experiência.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança, pelos ensinamentos.

Ao meu amado marido Paulo Renato Vasques Kulpa pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos e aos nossos filhos Fernando e Henrique, extensão do nosso amor.

Aos colegas e amigos do laboratório, Patrícia Dias de Araújo, Stéfanie P. Muraro, Tiago Fazolo, Cristian Roncada, Rodrigo Godinho, muito obrigada por compartilharem seus conhecimentos.

Um agradecimento especial à colega Gisele A. Funchal, por compartilhar seu conhecimento de Imunologia. Obrigada por todas as explicações.

Aos colegas do Mestrado pela ajuda, troca de experiências e amizade, em especial à colega e amiga Juliane Iepsen, companheira de todas as horas, compartilhando as dúvidas e as conquistas.

À minha cunhada Renata Helena Vasque Kulpa, por seu amor e incentivo.

Às secretárias Carla Carmo de Melo Rothmann (PPG-Pediatria) e Elisangela Baraldi de Mello (IPB), pela amizade e apoio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional.

Muito obrigada!

“Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive”.

Fernando Pessoa – 14/02/1933

RESUMO

Introdução: a bronquiolite viral aguda (BVA) é uma infecção respiratória de elevada incidência em lactentes. Os mecanismos associados à severidade da doença são ainda pouco conhecidos. Sua gravidade pode estar associada a fatores genéticos e imunológicos. Alguns mediadores da resposta imune parecem influenciar a resposta aos vírus, especialmente as interleucinas (*ILs*). A *IL-17* é uma citocina pró-inflamatória presente no aspirado traqueal de pacientes com BVA. Esta interleucina induz a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias e a migração de neutrófilos. O objetivo deste estudo foi avaliar se variações de *IL-17* estão associadas à severidade da BVA.

Métodos: no estudo foram incluídos lactentes internados na emergência pediátrica do SUS do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS com diagnóstico de BVA, com idade inferior a 12 meses, entre setembro de 2009 a setembro de 2011, e lactentes que não apresentaram BVA, recrutados junto ao Centro de Saúde Bom Jesus (CSBJ). Foram coletadas amostras de sangue capilar e deste material foi extraído o DNA utilizado para genotipagem do polimorfismo de nucleotídeo único, SNP rs2275913 do gene *IL-17*.

Resultados: participaram da análise final deste estudo de associação genética 121 casos e 71 controles. O alelo raro do SNP rs2275913 de *IL-17* mostrou um efeito de proteção para BVA grave, apresentando frequência maior de homocigotos AA (14,1% vs 5,8%, $p = 0,047$) em pacientes do grupo controle (sem hospitalização por BVA). O risco dos pacientes portadores do alelo G apresentarem bronquiolite com hospitalização foi 2,7 vezes maior.

Conclusão: o estudo sugere que o alelo A do polimorfismo rs2275913, no gene *IL-17*, está associado à proteção da BVA e pode influenciar diretamente a gravidade da BVA em lactentes. Este polimorfismo pode ser um importante marcador para identificação de pacientes de alto risco para bronquiolite grave.

Palavras-chave: bronquiolite, polimorfismo, interleucina-17, sibilância.

ABSTRACT

Introduction: acute viral bronchiolitis (AVB) is a respiratory infection of high incidence in infants. The mechanisms associated with the severity of the disease are poorly understood. Its severity may be associated with genetic and immunological factors. Some mediators of the immune response appear to influence the response to the virus, especially interleukins (IL). IL-17 is a pro-inflammatory cytokine present in the tracheal aspirates from patients with AVB. This interleukin induces the expression of other pro-inflammatory cytokines, and migration of neutrophils. The objective of the study was to determine if *IL-17* gene variations are associated with the severity of AVB.

Methods: in the present study we recruited infants admitted in the pediatric emergency in the *Hospital São Lucas (HSL) PUCRS* diagnosed with AVB and younger than 12 months of age, from September 2009 to September 2011; and infants without hospitalization selected at the primary health care center (*CSBJ*) in Porto Alegre. Capillary blood samples were collected and DNA was extracted for genotyping of single nucleotide polymorphism (SNP rs2275913 of the *IL -17* gene).

Results: participated in the final analysis of this genetic association study 121 cases and 71 controls. The rare allele of SNP rs2275913 of *IL -17* showed a protective effect for severe AVB, with higher frequency of homozygous AA (14.1% vs 5.8%; $p = 0.047$) in the control group (without hospitalization). The risk of G carriers for severe bronchiolitis was 2.7 times greater.

Conclusion: the study suggests that the polymorphism rs2275913 of *IL -17* is associated with protection of AVB and can directly influence the severity of AVB these children. This variation may be a marker to identify high risk patients.

Keywords: bronchiolitis, polymorphism, interleukin -17, wheezing.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Seleção de estudos sobre o papel da <i>IL-17</i> na bronquiolite viral aguda e na asma.	32
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1. Dados descritivos da amostra comparando o grupo em estudo versus o grupo controle.....	54
Tabela 2.a) Resultados da genotipagem, frequência alélica e desvio do equilíbrio de <i>Hardy Weinberg</i> (EHW) para o SNP rs2275913.....	55
Tabela 2.b) Resultados do desvio do equilíbrio de <i>Hardy Weinberg</i> (EHW) para o SNP rs2275913, estratificado para casos e controles.....	55
Tabela 3.a) Comparação da frequência dos genótipos entre casos e controles.....	56
Tabela 3.b) Comparação dos genótipos, utilizando um modelo recessivo (ocorrência de homocigoto AA no SNP rs2275913).	56
Tabela 4. Comparação entre variáveis de gravidade clínica do grupo BVA e a ocorrência de homocigoto AA no SNP rs2275913.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AB	<i>Applied Biosystems</i>
AVB	<i>Acute viral bronchiolitis</i>
BVA	Bronquiolite viral aguda
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CT	<i>Threshold cycle</i>
CX	<i>Chemokine</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio padrão
HSL	Hospital São Lucas
IC	Intervalo de confiança
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNKT	<i>Invariant natural killer T</i>
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
LPS	Lipopolissacarídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
O ₂	Oxigênio
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase

pg/ml	Picograma por mililitro
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Th2	<i>T helper 2</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
TMO	Transplante de medula óssea
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TregFOXP3 ⁺	<i>T regullatory cells</i> FOXP3 ⁺
UTI	Unidade de terapia intensiva
VM	Ventilação mecânica
VSR	Vírus sincicial respiratório
μ L	Microlitro(s)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1.1 APRESENTAÇÃO	16
1.2 JUSTIFICATIVA	18
1.3 OBJETIVOS	19
1.3.1 Objetivo geral.....	19
1.3.2 Objetivos específicos.....	19
1.4 REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO II.....	22
2.1 ARTIGO DE REVISÃO.....	23
CAPÍTULO III	37
3.1 ARTIGO ORIGINAL	38
CAPÍTULO IV.....	58
4.1 CONCLUSÕES	59

CAPÍTULO I

1.1 APRESENTAÇÃO

A bronquiolite viral aguda (BVA) é uma inflamação das vias aéreas inferiores, causada por vírus respiratórios sazonais. O vírus sincicial respiratório (VSR) é o principal agente etiológico.^{1,2} Muitos lactentes são infectados por este vírus no seu primeiro ano de vida.³ No Brasil e na maioria dos países, a BVA por VSR é a principal causa de hospitalização desta população por infecção respiratória nos meses de inverno.^{2,4}

Vários fatores de risco predis põem os lactentes à BVA grave por VSR, como prematuridade, cardiopatia congênita, entre outros.^{3,5} No entanto, estes fatores não conseguem explicar todos os casos graves de bronquiolite por VSR, principalmente os casos de crianças infectadas pelo vírus que eram previamente saudáveis quando hospitalizadas.^{3,6,7} O VSR caracteriza-se por não produzir resposta imune duradoura, podendo ocorrer reinfecção pela mesma cepa viral.^{6,8} Até o momento não temos uma vacina para este vírus.⁸⁻¹⁰ O tratamento para a bronquiolite consiste basicamente em oferecer suporte ao paciente, de acordo com a gravidade das manifestações clínicas.

Embora a BVA seja uma das patologias de maior incidência em lactentes até os 2 anos de idade, os mecanismos associados à severidade da doença são ainda pouco conhecidos.¹ A gravidade da doença por VSR em uma população de lactentes previamente saudáveis pode variar bastante, sugerindo que prováveis fatores do hospedeiro ou fatores associados ao vírus podem influenciá-la.¹¹ Dessa forma, a carga viral,^{1,7} a susceptibilidade genética para bronquiolite causada por VSR associada a variações genéticas da resposta imune inata¹¹⁻¹³ que modificam esta resposta imune, são prováveis fatores relevantes para variação da gravidade da doença.

As interleucinas (IL) são mediadores da resposta imune que podem influenciar diretamente a resposta ao VSR. A *interleucina 17 (IL-17)* é uma citocina pró-inflamatória presente no aspirado traqueal de pacientes com BVA.^{14,15} Esta interleucina induz a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias e a migração de neutrófilos.¹⁶ Tem-se buscado conhecer mais sobre o papel da IL-17 nas doenças obstrutivas das vias aéreas em crianças.

O sequenciamento completo do genoma humano (1990-2003), realizado por vários cientistas, forneceu informações essenciais a respeito da base genética que caracteriza a espécie humana. Este trabalho identificou nos 46 cromossomos da espécie humana 3,1 bilhões de pares de bases (pb) e 29 mil genes.¹⁷ Descobriu-se que a sequência do DNA (ácido desoxirribonucleico) humano é 99,9% idêntica em todos os indivíduos. Essa diferença de 0,1% nas sequências de bases do DNA contribui para a expressão de milhares de características fenotípicas distintas, nos tornando indivíduos com identidade genética exclusiva. Variações frequentes nestas sequências de DNA são denominadas de polimorfismos genéticos. Quando essa variação for observada em pelo menos 1% da população, em uma determinada posição cromossômica ou locus gênico, dizemos que o indivíduo apresenta um polimorfismo de nucleotídeo único, ou *single nucleotide polymorphism* (SNP). Variações na sequência de nucleotídeos podem levar a alteração na composição de aminoácidos em uma proteína que conseqüentemente pode alterar sua função e prejudicar o paciente no momento da infecção. Essas variações podem estar relacionadas a uma maior ou menor susceptibilidade em desenvolver determinadas patologias, bem como influenciar os fatores que determinam sua gravidade (www.hapmap.org). Os polimorfismos de *IL-17* estão entre essas variações genéticas e podem estar associados à susceptibilidade genética do hospedeiro ao VSR.

Dessa forma, o conhecimento de polimorfismos da *IL-17* associados à severidade da BVA pode ter significância clínica, identificando pacientes de alto risco para BVA grave.

1.2 JUSTIFICATIVA

A infecção respiratória por VSR em lactentes pode manifestar-se de forma variada. As crianças podem apresentar desde um quadro de infecção leve das vias aéreas superiores até uma forma mais grave da doença, com infecção grave das vias aéreas inferiores,¹⁸ necessitando de internação em uma unidade de tratamento intensivo (UTI). A variação da gravidade pode estar associada a polimorfismos genéticos. Os polimorfismos são variações genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior que 1%. Eles podem estar relacionados a uma maior ou menor susceptibilidade do indivíduo em desenvolver determinadas patologias, bem como influenciar os fatores que determinam sua gravidade.

A associação entre polimorfismos genéticos de *IL-17* e a BVA grave pode ajudar na identificação precoce de pacientes de risco para a forma mais grave da doença.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

- Avaliar a frequência do polimorfismo rs2275913 de *IL-17* em lactentes com e sem BVA;

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a associação entre o polimorfismo rs2275913 de *IL-17* e a gravidade da BVA em lactentes hospitalizados.
-

1.4 REFERÊNCIAS

1. DeVincenzo JP, El Saleeby CM, Bush AJ. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(11):1861-8.
 2. Simoes EA. Respiratory syncytial virus infection. *The Lancet*. 1999;354(9181):847.
 3. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel Jr EF, Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in Medicaid. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(6):865-70.
 4. Faber TE, Groen H, Welfing M, Jansen KJ, Bont LJ. Specific increase in local IL-17 production during recovery from primary RSV bronchiolitis. *Journal of medical virology*. 2012;84(7):1084-8.
 5. WELLIVER RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *The Pediatric infectious disease journal*. 2003;22(2):S6-S12.
 6. Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of virology*. 2008;82(5):2040-55.
 7. Houben M, Coenjaerts F, Rossen J, Belderbos M, Hofland R, Kimpen J, et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. *Journal of medical virology*. 2010;82(7):1266-71.
 8. Braciale TJ. Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(2):141-6.
 9. Bueno SM, González PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *International immunopharmacology*. 2008;8(10):1320-9.
 10. Hurwitz JL. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Expert review of vaccines*. 2011;10(10):1415-33.
 11. Miyairi I, DeVincenzo JP. Human genetic factors and respiratory syncytial virus disease severity. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(4):686-703.
 12. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax*. 2000;55(12):1023-7.
 13. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(6):826-34.
-

-
14. Mukherjee S, Lindell DM, Berlin AA, Morris SB, Shanley TP, Hershenson MB, et al. IL-17–induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. *The American journal of pathology*. 2011;179(1):248-58.
 15. Stoppelenburg AJ, Salimi V, Hennis M, Plantinga M, Huis R, Walk J, et al. Local IL-17A Potentiates Early Neutrophil Recruitment to the Respiratory Tract during Severe RSV Infection. *PloS one*. 2013;8(10):e78461.
 16. Tan H-L, Rosenthal M. IL-17 in lung disease: friend or foe? *Thorax*. 2013;68(8):788-90.
 17. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
 18. Simoes EA, Carbonell-Estrany X. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *The Pediatric infectious disease journal*. 2003;22(2):S13-S20.
-

CAPÍTULO II

2.1 ARTIGO DE REVISÃO

O papel da interleucina-17 nas doenças obstrutivas das vias aéreas em crianças **Role of interleukin-17 in the obstructive airway diseases in children**

Autores

Magáli Mocellin (1), Leonardo Araújo Pinto (2).

1. Enfermeira, mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

2. Médico, professor da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

Currículo dos autores está disponível na Plataforma Lattes do CNPq.

Fonte financiadora: não se aplica neste artigo de revisão.

Autor para correspondência: Leonardo A. Pinto, Avenida Ipiranga, 6690, 2º andar, Instituto de Pesquisas Biomédicas. CEP: 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: leonardo.pinto@puers.br.

RESUMO

Objetivo: descrever o papel da interleucina-17 (IL-17) na susceptibilidade para doenças respiratórias obstrutivas da infância como a bronquiolite viral aguda (BVA) e a asma (AS).

Métodos: os artigos incluídos na presente pesquisa foram publicados na base de dados Medline (NCBI). A busca baseou-se em uma combinação de descritores em inglês, sendo eles: *interleukin-17*, *acute viral bronchiolitis* e *asthma*, no mês de junho de 2013, usando os seguintes filtros: artigos dos últimos 10 anos, estudos em humanos, na língua inglesa.

Resultados: neste estudo foram selecionados 24 artigos referentes ao tema da pesquisa. Destes primeiros 24 artigos, 2 foram excluídos porque não apresentavam texto integral em inglês e 12 foram excluídos por se referirem a outras interleucinas/genes ou outras patologias, resultando num total de 10 artigos (3BVA/7AS). Alguns trabalhos mediram os níveis da IL-17 na secreção respiratória e demonstraram concentração elevada de IL-17 em lactentes internados com BVA por vírus sincicial respiratório (VSR). Na asma, além das células Th2, as células Th17/IL-17 exercem um importante papel na inflamação das vias aéreas, onde foram encontradas em maiores concentrações. Com base nesta revisão, observamos que a IL-17 desempenha um importante papel no recrutamento e ativação de neutrófilos podendo contribuir para as doenças inflamatórias das vias aéreas como a bronquiolite e a asma.

Conclusões: a presença aumentada de IL-17 nas amostras de crianças infectadas por VSR pode estar relacionada com o aparecimento de doenças crônicas obstrutivas pulmonares e asma. Porém, a presença de resultados controversos na BVA por VSR, onde temos níveis aumentados desta proteína nos lactentes graves e nos lactentes em fase de recuperação, sugere que o papel da IL-17 necessita de mais estudos, pois os mecanismos pelos quais esta interleucina atua ainda não são completamente compreendidos.

ABSTRACT

Objective: to describe the role of interleukin-17 (IL-17) in susceptibility to obstructive respiratory diseases of childhood such as acute viral bronchiolitis (AVB) and asthma (AS).

Methods: articles included in this research were published in Medline database (NCBI). The search was based on a combination of descriptors in English, as follows: interleukin-17, acute viral bronchiolitis and asthma, in June 2013, using the following filters: articles from the last 10 years, studies in humans, language English.

Results: in this study 24 articles related to the topic of the research were selected. These first 24 articles, 2 were excluded because they did not show full text in English and 12 were excluded because they refer to other interleukins/genes or other conditions, resulting in a total of 10 articles (3AVB/7AS). Some studies measured the levels of IL-17 in respiratory secretions and demonstrated high concentration of IL-17 in infants hospitalized with AVB by respiratory syncytial virus (RSV). In asthma, in addition to Th2 cells, Th17/IL-17 cells play a major role in the airway inflammation, which were found at higher concentrations. Based on this review, we observed that IL-17 plays an important role in the recruitment and activation of neutrophils may contribute to inflammatory airway diseases such as bronchiolitis and asthma.

Conclusions: the increased presence of IL-17 in the samples of children infected by RSV may be related to the onset of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. However, the controversial results in RSV acute bronchiolitis, which have increased levels of this protein in severe infants and in infants in the recovery phase, suggests that the role of IL-17 requires further study, since the mechanisms by which this operates interleukin are not yet completely understood.

INTRODUÇÃO

A interleucina 17 (IL-17) é uma proteína homodimérica clonada por Rouvier et al em 1993. A *IL-17A* foi o primeiro membro da família a ser clonado e foi denominada originalmente como linfócito T citotóxico associado ao antígeno-8 (CTLA-8).¹ Em humanos, o gene da *IL-17* foi identificado no braço curto do cromossomo 6 (6p12).² Entre 2000 e 2002 outros membros da IL-17 foram descritos: IL-17B, C, D, E e F, formando a família da IL-17.³⁻⁵ A IL-17A e a IL-17F são aproximadamente 50% homólogas,⁶ compartilhando o mesmo receptor e elementos reguladores.⁷ A IL-17 também é denominada IL-17A.

Além das células Th17, originadas das células T CD4⁺ ativadas, outras células da imunidade inata e adaptativa expressam IL-17 como as células T CD8⁺,^{8, 9} células Treg FOXP3⁺,¹⁰ células T iNK,¹¹ os linfócitos B, entre outras. Em 2011, descobriu-se que linfócitos B provenientes das tonsilas também são fontes de IL-17.¹² Em resposta à estimulação com lipopolissacarídeo (LPS), também foi detectado RNA mensageiro (mRNA) de IL-17 em neutrófilos.¹³ As células Th17 são responsáveis principalmente pela produção de IL-17A, IL-17F, IL-6, TNF- α e expressão de IL-22.⁶

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória associada a doenças autoimunes¹⁴⁻¹⁶ e a doenças inflamatórias crônicas como a colite ulcerativa¹⁴ e a asma.¹⁷ A IL-17A tem sido relatada desempenhando um papel específico na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas, enquanto a IL-17F está envolvida no desenvolvimento de asma e inflamação da via aérea.¹⁸

Estudos *in vivo* e *in vitro*^{19, 20} têm procurado esclarecer os mecanismos pelos quais a IL-17 atua na patogênese das doenças respiratórias, como na bronquiolite e na asma. Foram relatados níveis aumentados da IL-17 no aspirado traqueal de lactentes com bronquiolite por VSR¹⁹⁻²¹ e níveis aumentados desta proteína em biópsias brônquicas, no lavado broncoalveolar, no escarro e no sangue de pacientes asmáticos.²²⁻²⁷

Fatores genéticos e imunológicos são alvos destes estudos buscando uma melhor compreensão destes mecanismos. O objetivo do presente estudo é apresentar uma revisão de artigos sobre a influência da IL-17 na susceptibilidade para doenças respiratórias obstrutivas da infância, como a bronquiolite e a asma.

MÉTODOS

Os artigos incluídos na presente pesquisa foram publicados na base de dados *Medline* (NCBI). A busca baseou-se em uma combinação de descritores em inglês, sendo eles: *interleukin-17, acute viral bronchiolitis and asthma* no mês de junho de 2013 usando os seguintes filtros: artigos dos últimos 10 anos, em humanos, na língua inglesa. Os artigos foram avaliados pelo autor e os que não preencheram os critérios de inclusão foram excluídos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram selecionados 24 artigos referentes ao tema da pesquisa. Destes primeiros 24 artigos, 2 foram excluídos porque não apresentavam texto integral em inglês e 12 foram excluídos por se referirem a outras interleucinas/genes ou outras patologias, resultando num total de 10 artigos (3BVA/7AS). Além disso, foram incluídos 2 artigos sobre o papel da IL-17 ou das células Th17 no desenvolvimento de doenças respiratórias na infância. Alguns trabalhos mediram os níveis da IL-17 na secreção respiratória e demonstraram concentração elevada desta proteína em lactentes internados com BVA por VSR.

O papel das células Th17/IL-17 nas doenças obstrutivas das vias aéreas tem sido investigado e tem se tornado evidente a importância destas células nas doenças inflamatórias. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória e pertence a uma categoria diferenciada de citocinas que coordenam a inflamação do tecido local, induzindo a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, exercendo um papel importante na ativação e recrutamento dos neutrófilos.²⁸ A IL-17A tem sido associada a várias doenças autoimunes¹⁴⁻¹⁶ e alérgicas, incluindo a asma.¹⁷

O papel da IL-17 nas infecções

Um estudo de associação genética na periodontite mostrou níveis aumentados de IL-17A conferindo proteção para a doença. O genótipo homocigoto AA não foi encontrado

em nenhum paciente do grupo casos, somente nos controles e foi associado com alta expressão de IL-17A.²⁹ Faber et al²¹ também demonstraram em 2012 que os níveis de IL-17 nas vias respiratórias de pacientes com BVA por VSR aumentam durante a recuperação dos pacientes internados não ventilados, sugerindo que a IL-17 pode exercer um papel no controle da doença.

Outros dois estudos^{17, 30} mostraram uma associação de risco do alelo A de *IL-17A*, rs2275913 para infecção bacteriana. No estudo de Chen e colaboradores,¹⁷ as crianças com bronquiolite por VSR, homozigotas para este alelo, tiveram mais infecção por *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* quando comparadas com outros genótipos. Outro estudo realizado na China³⁰ sugere que os pacientes com o genótipo AA de *IL-17A*, rs2275913, portadores da bactéria *Helicobacter pylori*, têm risco aumentado para câncer gástrico quando comparados com os pacientes sem a bactéria. Os autores sugerem que essa variante interage com a infecção por *H. pylori*. Também foram relatados níveis aumentados da IL-17 no aspirado traqueal de lactentes graves com BVA por VSR internados na UTI,^{19,20} sugerindo que a IL-17A está associada a fator de risco para BVA grave.

Estes resultados controversos nas doenças infecciosas, onde temos níveis aumentados da IL-17A associados à proteção como na periodontite de Saraiva e na BVA descrita por Faber, e também níveis aumentados da IL-17A associados a risco como nos estudos de BVA de Mukherjee e Stoppelenburg, poderiam ser explicados pela complexa inter-relação gene-ambiente ou por fatores epigenéticos como a metilação do DNA (CpG).³¹ Além disso, não é possível descartar que existam níveis “ótimos” de IL-17 para uma resposta imune adequada, e que tanto níveis muito baixos ou muito altos sejam prejudiciais para o paciente.

O papel da IL-17 na bronquiolite viral aguda

A bronquiolite viral aguda (BVA) é uma doença inflamatória aguda das vias aéreas inferiores, decorrente de uma infecção das vias aéreas superiores, provocando obstrução destas pequenas vias. O vírus sincicial respiratório (VSR) é o principal agente etiológico^{32,33} e quase todas as crianças se infectam por este vírus nos primeiros 2 anos de vida. As principais alterações fisiopatológicas da BVA estão relacionadas às alterações

inflamatórias dos bronquíolos. A maior parte das células das secreções nasofaríngeas e do lavado broncoalveolar de pacientes com VSR é constituída de neutrófilos, caracterizando a inflamação nestes tecidos.³⁴⁻³⁶ Além da inflamação, o VSR também provoca necrose e descamação do epitélio, com edema e hipersecreção de muco, obstruindo facilmente estas vias de pequeno calibre. Hiperinsuflação, atelectasia e sibilância caracterizam a clínica da BVA.³³

Segundo Jenssen e colaboradores, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes da imunidade inata e genes como a *IL-17A*, que estão envolvidos na regulação desta imunidade, predis põem à BVA grave por VSR.³⁷ A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória e caracteriza-se por induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-8. Ambas citocinas desempenham um importante papel no recrutamento e ativação dos neutrófilos³⁸ para o sítio da inflamação.

Alguns estudos¹⁹⁻²¹ relataram níveis aumentados de IL-17 no aspirado traqueal de lactentes com bronquiolite por VSR. Mukherjee et al e Stoppelenburg et al relataram níveis aumentados da IL-17 no aspirado traqueal de lactentes graves com BVA por VSR internados na UTI, enquanto Faber et al demonstraram que os níveis de IL-17 nas vias respiratórias de pacientes com BVA por VSR aumentam durante a recuperação da doença na internação.

Mukherjee et al em 2011 realizaram um estudo *in vivo* e *in vitro* buscando esclarecer a patogenia do VSR na infecção primária e durante a exacerbação viral na doença alérgica pulmonar. A pesquisa mostrou que a IL-17 modula o aumento da produção de muco das vias aéreas, altera a resposta das células T CD8⁺ efetoras afetando a eliminação viral. Isto foi demonstrado através na neutralização da IL-17 com anti-IL-17 e também confirmado com a infecção de camundongos knockout para a *IL-17*. Além disso, a IL-17 participa da resposta alérgica pulmonar durante a infecção por VSR. Os autores sugerem que a presença aumentada de IL-17 nas amostras de crianças infectadas por VSR pode estar relacionada com o aparecimento de doenças crônicas obstrutivas pulmonares e asma. Neste estudo a IL-17 aumentou a infecção por VSR, assim como a doença da via aérea, com o aumento da produção da IL-17.

Stoppelenburg et al em 2013 também demonstraram, através de infecção por VSR *in vivo*, que os linfócitos presentes nos pulmões dos camundongos produziam IL-17A,

sendo os linfócitos T CD4⁺ os principais responsáveis pela produção destas células. Além disso, o tratamento destes camundongos com anticorpo inibidor de IL-17A foi capaz de diminuir a infiltração de neutrófilos nos pulmões durante a infecção, sugerindo que a IL-17A está associada à infiltração de neutrófilos nas vias aéreas. O estudo também avaliou os níveis aumentados da IL-17A no aspirado traqueal de recém-nascidos que correlacionaram-se com a infiltração neutrofílica precoce nas vias aéreas destes pacientes com BVA grave por VSR. Estes resultados controversos com relação aos níveis aumentados da IL-17 e os desfechos da doença (gravidade/resolução) demonstram que o papel da IL-17 na infecção por VSR permanece indefinido e necessita de mais estudos para um melhor entendimento da sua patogênese.

O papel da IL-17 na asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas altamente complexa, associada a vários fatores ambientais como a exposição ao fumo, à poluição e a infecções, e também à predisposição genética.³⁹ A doença é relacionada à excessiva resposta imune Th2 em resposta a alérgenos ambientais em indivíduos geneticamente predispostos e possui uma série de características próprias. As células Th2 produzem vários mediadores que perpetuam a resposta imune. Estes mediadores apresentam inúmeras funções como aumentar a sobrevivência e ativação dos eosinófilos nos pulmões, ativar os eosinófilos a fazerem a mudança de classe para IgE, provocar a hiperplasia das células caliciformes de Goblet, aumentando a produção de muco, e fazer o remodelamento tecidual das vias aéreas.⁴⁰ Esta resposta Th2 causa dano no epitélio e é caracterizada por hiper-reatividade das vias aéreas e inflamação mediada por eosinófilos, caracterizando a asma atópica.³⁹ Alguns estudos demonstraram que os neutrófilos também estão aumentados na asma, caracterizando a asma não atópica.⁴¹⁻⁴³ A asma atópica e não atópica se diferenciam pelo aumento e normalidade nos valores de anticorpos IgE em resposta aos alérgenos ambientais.⁴⁴ Todos os fenótipos de asma apresentam inflamação das vias aéreas.⁴⁵

Além das células Th2, as células Th17/IL-17 exercem um importante papel na inflamação das vias aéreas⁴⁶ e têm sido associadas à asma, onde foram encontradas em maiores concentrações em biópsias brônquicas, no lavado broncoalveolar, no escarro e no sangue destes pacientes.²²⁻²⁷

Em 2010, Agache identificou que pacientes com asma severa apresentavam maiores níveis séricos de IL-17, apresentando quase o dobro dos níveis dos pacientes com asma leve/moderada. Este estudo colabora com outros achados que identificaram previamente aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com asma severa. O estudo concluiu que a presença aumentada de IL-17 (IL-17 > 20pg/ml) no soro destes pacientes é um fator de risco independente para asma severa.

Scanlon et al em 2011⁴⁷ demonstraram, em um estudo *in vitro*, que as células B positivas para IgE (B IgE⁺) são capazes de migrar em resposta à IL-17A, via quimiocina CCL28. Desta forma, a CCL28, além da IL-17A, torna-se importante para a asma alérgica.

A IL-17 atua recrutando, ativando e regulando a migração dos neutrófilos para os pulmões. A IL-17 aumenta a expressão de várias outras citocinas pró-inflamatórias, entre elas a IL-8.³⁸ A IL-8 está aumentada nas vias aéreas de pacientes asmáticos^{42, 48} exercendo também um papel importante no recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação. Além de causar dano tecidual direto nas vias aéreas, os neutrófilos podem perpetuar a inflamação, provocando crônicas alterações na função das vias aéreas como o remodelamento tecidual. Este processo patogênico de remodelamento acontece devido à hiperplasia e hipertrofia celular das camadas de músculo liso e das células produtoras de muco, diminuindo a luz dos brônquios.⁷

CONCLUSÕES

Com base nesta revisão, observamos que a IL-17 desempenha um importante papel no recrutamento e ativação de neutrófilos para as vias aéreas, podendo contribuir para doenças inflamatórias como a bronquiolite e a asma. A presença aumentada de IL-17 nas amostras de crianças infectadas por VSR pode estar relacionada com o aparecimento de doenças crônicas obstrutivas pulmonares e asma. Porém, a presença de resultados controversos na BVA por VSR, onde temos níveis aumentados desta proteína nos lactentes graves e nos lactentes em fase de recuperação, sugere que o papel da IL-17 necessita de mais estudos, pois os mecanismos pelos quais esta interleucina atua ainda não são completamente compreendidos. Além disso, pode-se considerar a hipótese de que existam níveis normais de IL-17 para uma resposta imune eficiente, e que tanto níveis muito baixos ou muito altos sejam prejudiciais para o paciente.

FIGURAS

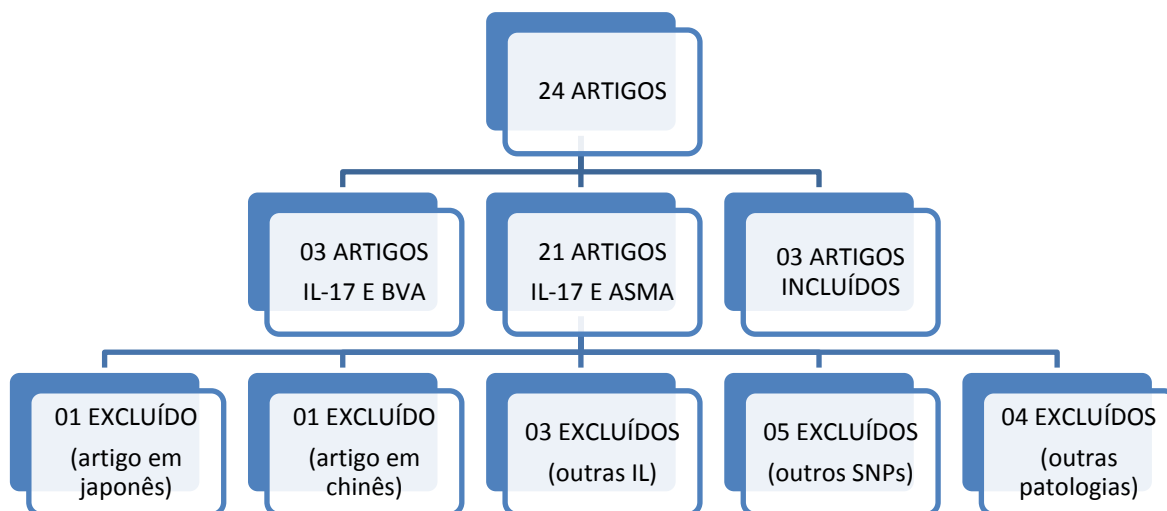


Figura 1. Seleção de estudos sobre o papel da IL-17 na bronquiolite viral aguda e na asma.

REFERÊNCIAS

1. Rouvier E, Luciani M, Mattei M, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *The Journal of Immunology*. 1993;150(12):5445-56.
 2. Moseley T, Haudenschild D, Rose L, Reddi A. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(2):155-74.
 3. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(2):773-8.
 4. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *The Journal of Immunology*. 2002;169(2):642-6.
 5. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *The Journal of Immunology*. 2002;169(1):443-53.
 6. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008;28(4):454-67.
 7. Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. T Helper 17 Cells in Airway Diseases. *CHEST Journal*. 2013;143(2):494-501.
 8. Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *The Journal of Immunology*. 2003;170(9):4432-6.
 9. Chang Y, Nadigel J, Boulais N, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH, et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2011;12(43):10.1186.
 10. Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Bioley G, et al. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the TH17 lineage-specific transcription factor ROR γ t. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(21):8635-40.
 11. Michel M-L, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1neg iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(5):995-1001.
 12. Vazquez-Tello A, Halwani R, Li R, Nadigel J, Bar-Or A, Mazer BD, et al. IL-17A and IL-17F expression in B lymphocytes. *International archives of allergy and immunology*. 2011;157(4):406-16.
-

13. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *The Journal of Immunology*. 2003;170(4):2106-12.
 14. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *Journal of clinical immunology*. 2008;28(1):44-9.
 15. Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PloS one*. 2011;6(10):e26229.
 16. Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Førre ØT, Helgetveit K, et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology*. 2009;48(4):367-70.
 17. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(4):539-45.
 18. Hizawa N, Kawaguchi M, Huang SK, Nishimura M. Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clinical & Experimental Allergy*. 2006;36(9):1109-14.
 19. Mukherjee S, Lindell DM, Berlin AA, Morris SB, Shanley TP, Hershenson MB, et al. IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. *The American journal of pathology*. 2011;179(1):248-58.
 20. Stoppelenburg AJ, Salimi V, Hennis M, Plantinga M, Huis R, Walk J, et al. Local IL-17A Potentiates Early Neutrophil Recruitment to the Respiratory Tract during Severe RSV Infection. *PloS one*. 2013;8(10):e78461.
 21. Faber TE, Groen H, Welfing M, Jansen KJ, Bont LJ. Specific increase in local IL-17 production during recovery from primary RSV bronchiolitis. *Journal of medical virology*. 2012;84(7):1084-8.
 22. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;111(6):1293-8.
 23. Molet S, Hamid Q, Davoineb F, Nutku E, Tahaa R, Pagé N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001;108(3):430-8.
-

24. Bullens D, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx. *Respir Res.* 2006;7(1):135.
 25. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respiratory medicine.* 2003;97(6):726-33.
 26. Yong-chang S, Qing-tao Z, Wan-zhen Y. Sputum interleukin-17 is increased and associated with airway neutrophilia in patients with severe asthma. *中华医学杂志.* 2005;118(11).
 27. Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respiratory medicine.* 2010;104(8):1131-7.
 28. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang S-K. IL-17 cytokine family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2004;114(6):1265-73.
 29. Saraiva AM, Alves e Silva MRM, Correia Silva JdF, da Costa JE, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. *Human immunology.* 2013;74(2):207-14.
 30. Zhang X, Zheng L, Sun Y, Zhang X. Analysis of the association of interleukin-17 gene polymorphisms with gastric cancer risk and interaction with *Helicobacter pylori* infection in a Chinese population. *Tumor Biology.* 2013:1-6.
 31. Kim SW, Kim ES, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2011;60(11):1527-36.
 32. Simoes EA. Respiratory syncytial virus infection. *The Lancet.* 1999;354(9181):847.
 33. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *New England Journal of Medicine.* 2001;344(25):1917-28.
 34. Everard ML, Swarbrick A, Wright M, McIntyre J, Dunkley C, James PD, et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Archives of disease in childhood.* 1994;71(5):428-32.
 35. Smith P, Wang SZ, Dowling K, Forsyth K. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *Journal of paediatrics and child health.* 2001;37(2):146-51.
 36. McNamara P, Ritson P, Selby A, Hart C, Smyth R. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Archives of disease in childhood.* 2003;88(10):922-6.
 37. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly
-

- associated with innate immune genes. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(6):826-34.
38. Tan H-L, Rosenthal M. IL-17 in lung disease: friend or foe? *Thorax*. 2013;68(8):788-90.
 39. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nature immunology*. 2002;3(8):715-20.
 40. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(3):193-204.
 41. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*. 2002;57(7):643-8.
 42. Ordoñez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: clinical and biologic significance. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(4):1185-90.
 43. Drews A, Pizzichini M, Pizzichini E, Pereira M, Pitrez P, Jones M, et al. Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy*. 2009;64(11):1597-601.
 44. Murphy DM. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *CHEST Journal*. 2010;137(6):1417-26.
 45. Fahy JV, Corry DB, Boushey HA. Airway inflammation and remodeling in asthma. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2000;6(1):15-20.
 46. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21(4):467-76.
 47. Scanlon KM, Hawksworth RJ, Lane SJ, Mahon BP. IL-17A induces CCL28, supporting the chemotaxis of IgE-secreting B cells. *International archives of allergy and immunology*. 2011;156(1):51-61.
 48. Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Bérubé J, Olivenstein R, et al. IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *The Journal of Immunology*. 2010;184(8):4531-7.
-

CAPÍTULO III

3.1 ARTIGO ORIGINAL

Associação entre o polimorfismo rs2275913 de *IL-17* e a gravidade da bronquiolite aguda em lactentes

Autores

Magáli Mocellin (1), Lidiane Alves de Azeredo Leitão (1), Sofia Bezerra (2), Ana Luiza Azevedo (2), Ana Paula Duarte de Souza (3) e Leonardo Araújo Pinto (4)

1. Enfermeira, mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.
2. Aluna da graduação da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.
3. Bioquímica, Professora da Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.
4. Médico, Professor da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

Currículo dos autores está disponível na Plataforma Lattes do CNPq.

Fonte financiadora: FAPERGS

Autor para correspondência: Leonardo A. Pinto, Avenida Ipiranga, 6690, 2º andar, Instituto de Pesquisas Biomédicas. CEP 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: leonardo.pinto@pucrs.br.

RESUMO

Introdução: a bronquiolite viral aguda (BVA) é uma infecção respiratória de elevada incidência em lactentes. Os mecanismos associados à severidade da doença são ainda pouco conhecidos. Sua gravidade pode estar associada a fatores genéticos e imunológicos. Alguns mediadores da resposta imune parecem influenciar a resposta aos vírus, especialmente as interleucinas (*ILs*). A *IL-17* é uma citocina pró-inflamatória presente no aspirado traqueal de pacientes com BVA. Esta interleucina induz a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias e a migração de neutrófilos. O objetivo deste estudo foi avaliar se variações de *IL-17* estão associados à severidade da BVA.

Métodos: no estudo foram incluídos lactentes internados na emergência pediátrica do SUS do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS com diagnóstico de BVA, com idade inferior a 12 meses, entre setembro de 2009 a setembro de 2011, e lactentes que não apresentaram BVA, recrutados junto ao Centro de Saúde Bom Jesus (CSBJ). Foram coletadas amostras de sangue capilar e deste material foi extraído o DNA utilizado para genotipagem do polimorfismo de nucleotídeo único, SNP rs2275913 do gene *IL-17*.

Resultados: participaram da análise final deste estudo de associação genética 121 casos e 71 controles. O alelo raro do SNP rs2275913 de *IL-17* mostrou um efeito de proteção para BVA grave, apresentando frequência maior de homozigotos AA (14,1% vs 5,8%, $p = 0,047$) em pacientes do grupo controle (sem hospitalização por BVA). O risco dos pacientes portadores do alelo G apresentarem bronquiolite com hospitalização foi 2,7 vezes maior.

Conclusão: o estudo sugere que o alelo A do polimorfismo rs2275913, no gene *IL-17A*, está associado à proteção da BVA e pode influenciar diretamente a gravidade da BVA em lactentes. Este polimorfismo pode ser um importante marcador para identificação de pacientes de alto risco para bronquiolite grave.

Palavras-chave: bronquiolite, polimorfismo, interleucina-17, sibilância.

ABSTRACT

Introduction: acute viral bronchiolitis (AVB) is a respiratory infection of high incidence in infants. The mechanisms associated with the severity of the disease are poorly understood. Its severity may be associated with genetic and immunological factors. Some mediators of the immune response appear to influence the response to the virus, especially interleukins (IL). IL-17 is a pro-inflammatory cytokine present in the tracheal aspirate in AVB patients. This interleukin induces the expression of other pro-inflammatory cytokines, and migration of neutrophils. The objective of the study was to determine if IL-17 gene variations are associated with the severity of AVB.

Methods: in the present study we recruited infants admitted in the pediatric emergency in the *Hospital São Lucas (HSL) PUCRS* diagnosed with AVB and younger than 12 months of age, from September 2009 to September 2011; and infants without hospitalization selected at the primary health care center (*CSBJ*) in Porto Alegre. Capillary blood samples were collected and DNA was extracted for genotyping of single nucleotide polymorphism (SNP rs2275913 of the *IL -17* gene).

Results: participated in the final analysis of this genetic association study 121 cases and 71 controls. The rare allele of SNP rs2275913 of *IL -17* showed a protective effect for severe AVB, with higher frequency of homozygous AA (14.1% vs 5.8%; $p = 0.047$) in the control group (without hospitalization). The risk of G carriers for severe bronchiolitis was 2.7 times greater.

Conclusion: the study suggests that the polymorphism rs2275913 of *IL -17* is associated with protection of AVB and can directly influence the severity of AVB in these children. This variation may be a marker to identify high risk patients.

Keywords: bronchiolitis, polymorphism, interleukin -17, wheezing.

INTRODUÇÃO

A bronquiolite viral aguda (BVA) é uma inflamação das vias aéreas inferiores, causada por vírus respiratórios sazonais, onde o vírus sincicial respiratório (VSR) é o principal agente etiológico.¹ A maior parte das crianças é infectada no primeiro ano de vida.² A infecção respiratória por VSR constitui a principal causa de hospitalização de lactentes nos meses de inverno.³ O VSR caracteriza-se por não produzir resposta imune duradoura, podendo ocorrer reinfecção.^{2, 4} Fatores de risco do hospedeiro como Síndrome de Down, prematuridade, baixo peso ao nascimento, faixa etária < 6 meses, cardiopatias congênitas, doenças neuromusculares e imunodeficiências predis põem os lactentes à BVA grave.⁵⁻⁷ No entanto, estes fatores não conseguem explicar todos os casos de bronquiolite por VSR, principalmente os casos graves de crianças infectadas pelo vírus que eram previamente saudáveis quando hospitalizadas.^{2, 3, 8} Ainda não existe uma vacina para o RSV.^{4, 5, 9, 10} Até o momento o tratamento para a bronquiolite consiste basicamente em oferecer suporte ao paciente, de acordo com a gravidade das manifestações clínicas.

Embora a BVA seja uma das patologias de maior incidência em lactentes até os 2 anos de idade, os mecanismos associados à severidade da doença são ainda pouco conhecidos.^{2, 11} A gravidade da infecção por VSR em uma população de lactentes previamente saudáveis é muito variável, indicando que prováveis fatores do hospedeiro ou fatores virais específicos a influenciam.¹² Além disso, a carga viral^{8, 11} e a susceptibilidade genética associada a variações das respostas imune inata e adaptativa,^{12, 13} também são prováveis fatores responsáveis por esta variação na gravidade da BVA causada por VSR.

As interleucinas (IL) são mediadores da resposta imune que podem influenciar diretamente a resposta ao VSR. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória presente no lavado broncoalveolar de pacientes com BVA por VSR.^{3, 14, 15} Esta interleucina induz a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias e a migração de neutrófilos.^{3, 16} Tem-se buscado conhecer mais sobre o papel da IL-17 nas doenças obstrutivas das vias aéreas em crianças. Em recente coorte de 2012, Faber e colaboradores³ demonstraram que os níveis de IL-17 nas vias respiratórias de pacientes com bronquiolite por VSR aumentam durante o curso da doença em pacientes internados, sugerindo que a IL-17 pode desempenhar um papel no controle da doença. Outros dois estudos recentes mostraram que níveis aumentados da IL-17 estão associados a fator de risco para a BVA causada por VSR.^{14, 15}

Em outro estudo de caso-controle de 2010,¹⁷ Chen et al investigaram a associação do SNP de *IL-17* (rs 2275913, G-152A) com asma na infância e colonização bacteriana da hipofaringe na bronquiolite. Este estudo mostrou que o alelo A e a frequência do genótipo AA do SNP rs2275913 foi significativamente maior no grupo de asma do que nos controles, sugerindo uma associação de risco para esta doença. Com relação à bronquiolite, os resultados foram marginalmente maiores no grupo de BVA do que nos controles. Também temos resultados controversos para o papel da IL-17 na gravidade das doenças respiratórias. Segundo artigo de revisão recente,¹⁶ o papel das células Th17 e da IL-17 pode ser tanto benéfico quanto patogênico, pois nem todas as células Th17 são iguais, podendo as mesmas terem diferentes funções, além da plasticidade das células Th, mostrando a complexidade das interações imunológicas.

Os polimorfismos genéticos são variações frequentes nas sequências de DNA. Essas variações na sequência de nucleotídeos podem levar a alterações na composição de aminoácidos em uma proteína que conseqüentemente pode alterar sua função e prejudicar o paciente no momento da infecção. Essas variações podem também estar relacionadas a uma maior ou menor susceptibilidade em desenvolver determinadas patologias, bem como influenciar os fatores que determinam sua gravidade (www.hapmap.org).

Poucos estudos de associação genética e bronquiolite causada por VSR ocorrem em populações de países em desenvolvimento. A maior parte dos estudos é realizada em países desenvolvidos como a Holanda, Inglaterra, Alemanha e Finlândia, onde predominam amostras populacionais caucasianas. Também temos estudos realizados na China e no Japão.

Portanto, o conhecimento de polimorfismos de *IL-17* associados à gravidade da BVA pode ter relevância clínica, identificando pacientes de alto risco para BVA grave. O objetivo principal do presente estudo foi comparar a frequência do polimorfismo rs2275913 de *IL-17* em lactentes com e sem BVA. Também avaliamos a associação entre o SNP rs2275913 de *IL-17* e marcadores de gravidade da BVA em lactentes hospitalizados.

METODOLOGIA

Delineamento do estudo:

Este é um estudo de associação genética com delineamento de caso-controle.

População e amostra:

Em um estudo de associação genética, quando consideramos uma frequência alélica de 0,04 (40%), uma força de associação com $OR = 2$, um poder de 90% e α de 0,001, o número total estimado é de 177 pacientes.¹⁸ Fazem parte da análise final deste estudo de associação genética 121 casos e 71 controles, totalizando 192 pacientes.

A amostra do estudo foi selecionada na emergência pediátrica do SUS do Hospital São Lucas (HSL), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Foram incluídas no estudo todas as crianças internadas, admitidas com diagnóstico de BVA. O grupo controle era de lactentes sem BVA que procuraram a puericultura ou o setor de imunização do Centro de Saúde Bom Jesus (CSBJ).

Crítérios de Inclusão:

Os critérios de inclusão para o grupo casos foram: pacientes internados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Hospital São Lucas da PUCRS com entrada na emergência pediátrica, entre setembro de 2009 a setembro de 2011; pacientes com suspeita clínica de BVA (primeiro episódio de sibilância acompanhado de infecções de vias aéreas superiores); lactentes menores de 12 meses de idade e necessidade de internação hospitalar (em enfermaria ou sala de observação). Para o grupo controle foi selecionada uma amostra de conveniência com lactentes que procuraram consulta de puericultura ou imunização no CSBJ, sem história prévia de internação por sibilância.

Critérios de exclusão:

Os critérios de exclusão compreenderam histórico de doenças pulmonares relacionadas à prematuridade (displasia broncopulmonar), pneumopatias crônicas, cardiopatias, síndromes genéticas, uso de corticóides sistêmicos ou inalatórios e pacientes cujos responsáveis recusaram-se a participar do estudo.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

A assinatura do termo de consentimento foi obtida junto ao responsável legal da criança, sujeito da pesquisa. O responsável autorizou a participação do paciente antes de qualquer procedimento. A identidade de todos os participantes da pesquisa foi mantida em sigilo. A pesquisa foi iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS e da Secretaria Municipal de Saúde (controles).

Procedimentos:

O protocolo de internação (casos) incluiu isolamento respiratório e coleta de secreção nasofaríngea (lavado nasal) de todos os pacientes com BVA. Com este material foi realizada imunofluorescência direta para os vírus influenza, parainfluenza, adenovírus e vírus sincicial respiratório no laboratório do HSL/PUCRS. Uma parte deste material foi armazenada para pesquisas com reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para vírus respiratórios.

A coleta de sangue foi planejada juntamente com o médico assistente para que a mesma fosse efetuada em momento oportuno, preferencialmente quando a coleta de sangue para realização de exames laboratoriais fosse solicitada pela equipe médica. As amostras de sangue foram armazenadas através do *FTA Classic Card* (Whatman, Florham Park, USA) no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS. Deste material foi extraído o DNA utilizado para o estudo relacionado ao polimorfismo do gene *IL-17*. As amostras congeladas serviram exclusivamente para os estudos relacionados à gravidade da doença e risco de sibilância. A gravidade da doença foi avaliada pelo tempo de internação, tempo de uso de oxigênio e tempo médio de sibilância durante a internação hospitalar.

Seleção do polimorfismo de *IL-17*

O polimorfismo de *IL-17* foi inicialmente rastreado utilizando a base de dados do projeto *Hapmap* (versão 28.0), a fim de selecionar as variações genéticas mais frequentes descritas em populações caucasianas.¹⁹ Este projeto descreve todos os polimorfismos frequentes em humanos e os dados de frequência em diferentes etnias. Com o suporte desta base de dados, identificamos o *tagging* SNP rs2275913 com frequência em populações caucasianas de 0,31.

Extração de DNA

A extração de DNA ocorreu a partir de amostras de sangue capilar, realizada em ambos os grupos (casos e controles) e armazenada em *FTA Classic Card*. O procedimento foi realizado com o uso de caneta própria para extração - *Harris Uni-core 1.25mm Punch* (Whatman, Florham Park, USA) para retirada das amostras de sangue. A extração foi realizada utilizando os reagentes: *FTA Purification Reagent* (Whatman), Tampão Tris-EDTA (TE) para lavagem da amostra e em seguida o material foi aquecido a 60° por 30 minutos com 20µl de água *Nuclease free* (Applied Biosystems - AB, Carlsbad, Califórnia) utilizando termociclador PTC-100™, (MJ Research, Quebec, Canadá), conforme orientação do fabricante.

Posteriormente, foram realizadas a quantificação das amostras de DNA com o *Kit DNAs Qubit* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) e realizada a reação de PCR em tempo real para o gene constitutivo da β -actina, utilizando a *TaqMan Universal PCR Master Mix*-catálogo 4304437 (AB) para certificação da qualidade da extração.

Genotipagem:

A genotipagem foi realizada com o objetivo de identificar o polimorfismo de interesse. Foram utilizadas as concentrações de 0,1ng e 0,25ng de DNA genômico na reação de PCR em tempo real para identificação do SNP. A *genotyping master mix*, catálogo 4371355 (AB) e os iniciadores da *IL-17, primer SNP genotyping assays* (AB), foram usados no processo de genotipagem com o suporte do equipamento StepOne™

Real-Time PCR System (AB) e os dados obtidos da amplificação (*threshold cycle- CT*) foram analisados pelo programa *StepOne* (versão 2.3). O resultado foi expresso em homozigoto frequente, heterozigoto, homozigoto raro ou indeterminado. Os indeterminados foram excluídos do estudo.

Análise Estatística:

A amostra do estudo foi constituída de crianças com BVA e de um grupo-controle. A análise foi descritiva utilizando testes de proporções, descrições em média (desvio padrão) e mediana (intervalo interquartil), conforme distribuição das variáveis. A associação entre as variáveis categóricas e desfechos dicotômicos foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. Associações entre variáveis categóricas e desfechos contínuos foram analisadas pelo teste *t* de *Student*. As análises foram realizadas com os programas SPSS (versão 17.0). Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Neste estudo de associação genética foram incluídos 121 casos e 72 controles, totalizando 193 pacientes com amostras de DNA disponíveis. Os pacientes com BVA e os controles apresentavam média de idade de 3,45 e 13,10 meses, respectivamente. A distribuição na variável sexo foi de 55,37% para o sexo masculino no grupo casos e 39,13% para o sexo masculino nos controles. A média de peso na internação foi de 5,73 para o grupo caso e de 8,59 para o grupo controle (Tabela 1). A taxa de sucesso da genotipagem foi de 99,48% (192/193). A frequência do alelo raro foi de 0,23 para o polimorfismo rs2275913 (Tabela 2a). Houve desvio do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* exclusivamente no grupo controle (Tabela 2b).

O SNP rs2275913 de *IL-17* mostrou um efeito de proteção para BVA grave (com hospitalização), apresentando frequência maior (14,1% vs 5,8%, $p = 0,047$) de homozigotos AA em pacientes do grupo controle (sem hospitalização). O risco dos pacientes não portadores do alelo A apresentarem bronquiolite grave foi 2,7 vezes maior.

Em uma subanálise, observamos que houve diferença significativa ao compararmos tempo de internação e sibilância nos pacientes somente entre o grupo casos (Tabela 4). Verificamos que os pacientes homozigotos para o alelo AA apresentaram tempo médio de internação menor quando comparados com pacientes de outros genótipos, ou seja, 3,57 e 6,17 dias, respectivamente. Ao analisarmos o tempo de oxigenioterapia, a duração média em dias de uso de O₂ foi reduzida praticamente pela metade para os pacientes homozigotos AA, ou seja, de 3,14 dias e de 5,54 dias para os pacientes GG/AG, porém esta diferença não atingiu significância estatística. Verificamos também que o tempo médio de sibilância durante a internação hospitalar foi reduzida a metade para os homozigotos AA, de 2,14 dias e 4,14 para os demais genótipos.

DISCUSSÃO

Neste estudo comparamos a frequência do polimorfismo rs2275913 de *IL-17* em lactentes com hospitalização por BVA e sem BVA/hospitalização. Também avaliamos a associação entre os polimorfismos rs2275913 e marcadores de gravidade da BVA entre os lactentes hospitalizados. O SNP rs2275913 de *IL-17* mostrou um efeito de proteção para BVA grave (com admissão hospitalar), apresentando frequência maior de homozigotos AA (14,1% vs 5,8%, $p = 0,047$) em pacientes do grupo controle (sem hospitalização). O risco dos pacientes portadores do alelo G apresentarem bronquiolite grave foi 2,7 vezes maior em comparação aos pacientes AA (OR 2,67: IC 95% 0,97 - 7,37). Em uma subanálise, observamos que houve diferença significativa ao compararmos tempo de internação e sibilância entre os pacientes do grupo BVA (Tabela 4). Ao analisarmos o tempo de oxigenioterapia, a duração média de uso de O₂ em dias foi reduzida praticamente pela metade para os pacientes homozigotos AA, porém esta diferença não atingiu significância estatística. Os resultados do estudo de caso-controle e a avaliação do tempo de internação no grupo BVA mostram resultados consistentes do efeito protetor do alelo A.

O SNP da *IL-17*, rs2275913, está localizado na região promotora do gene, no cromossomo 6p12.^{20, 21} Alguns estudos de associação genética mostraram o alelo A de rs2275913 (*IL-17*) conferindo proteção em alguns desfechos, como em 2 estudos de colite ulcerativa.^{21, 22} Em um estudo sobre periodontite, o alelo A também conferiu proteção. Além disso, o genótipo homozigoto AA não foi encontrado em nenhum paciente do grupo casos, somente nos controles e foi associado com alta expressão de IL-17A.²³

Em recente coorte de 2012, Faber et al³ demonstraram que os níveis de IL-17 nas vias respiratórias de pacientes com BVA por VSR aumentam durante o curso da doença em pacientes internados, sugerindo que a IL-17 pode desempenhar um papel no controle da doença. Também foram relatados níveis aumentados da IL-17 no aspirado traqueal de lactentes graves com BVA por VSR internados na UTI,^{14, 15} sugerindo que estes níveis elevados também poderiam estar associados a um fator de risco para BVA grave. Em nosso estudo não mensuramos os níveis da IL-17. O genótipo AA foi associado à proteção para BVA grave, apresentando frequência maior de homozigotos AA em pacientes do grupo controle (sem hospitalização) e possivelmente estaria associado à redução da

expressão desta proteína. Poucos estudos de associação genética da *IL-17A* na bronquiolite por VSR, SNP rs2275913, mensuraram os níveis da IL-17.

O mesmo alelo A também tem demonstrado um efeito de risco para doenças alérgicas e autoimunes, como em um estudo de 2010 sobre asma,¹⁷ outro estudo de colite ulcerativa²⁰ e na rejeição aguda no transplante de medula óssea (TMO).²⁴ Considerando a relação entre BVA e asma, estes achados podem ser considerados conflitantes. Porém, existem evidências de estudos de associação genética que já descreveram associações inversas para os desfechos BVA e asma.²⁵

Dois estudos^{17, 26} mostraram uma associação de risco do alelo A de *IL-17A*, rs2275913, para infecção bacteriana. No estudo de Chen e colaboradores, as crianças com bronquiolite por VSR homozigotas para este alelo tiveram mais infecção por *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* quando comparadas com outros genótipos. O estudo de Zhang et al sugere que os pacientes com o genótipo AA de *IL-17A*, rs2275913, portadores da bactéria *Helicobacter pylori*, têm risco aumentado para câncer gástrico quando comparados com os pacientes sem a bactéria. Os autores sugerem que essa variante pode influenciar o risco de infecção por *H. Pylori*, e consequentemente, câncer gástrico.

Estes resultados controversos, onde o genótipo AA pode ser tanto fator protetor como de risco, poderiam ser explicados por uma complexa interação entre gene-ambiente, fatores epigenéticos como a metilação do DNA (CpG), conforme estudo de Kim et al.²² A expressão desencadeada pelo genótipo AA pode ser variável dependendo das variações na metilação do DNA. Fatores ambientais no início da vida podem modificar o efeito do alelo, alterando sua capacidade de se expressar para mais ou para menos. Dessa forma, o efeito do SNP rs2275913, aumentando ou diminuindo os níveis da proteína IL-17, pode depender da metilação do DNA e de fatores ambientais, o que explicaria as variações nos resultados.

Podemos considerar como uma das limitações do presente estudo o desvio do equilíbrio de *Hardy-Weinberg (EHW)* no grupo controle, que pode estar relacionado ao pequeno tamanho amostral. Por outro lado, é importante considerar as dificuldades de recrutar pacientes deste grupo etário para estudos de associação genética. Neste estudo, não foram mensurados os níveis da IL-17, o que poderia contribuir para o entendimento desencadeado pelo SNP em estudo. Outra limitação deve-se à falta de conhecimento das características étnicas individuais da amostra.

Por outro lado, existem poucos estudos de associação genética sobre bronquiolite aguda em populações de países em desenvolvimento. A maior parte dos estudos foi realizada em países desenvolvidos como a Holanda, Inglaterra, Alemanha e Finlândia, onde predomina a etnia caucasiana. Também existem estudos realizados na China e no Japão. De acordo com dados da dbSNP, NCBI (*HapMap*), a frequência do alelo A do SNP rs2275913 é de 6% na população de africanos, 12% nos afro-americanos e 28% nos hispânicos. Estes dados demonstram que estas populações africanas ou afrodescendentes apresentam frequência menor do alelo A protetor, sugerindo que o risco elevado de bronquiolite grave nestas etnias poderia estar associado a esta variação na *IL17*.

Neste estudo, o SNP rs2275913 de *IL-17* mostrou um efeito de proteção para BVA grave, apresentando frequência maior de homozigotos AA em pacientes do grupo controle. O risco dos pacientes portadores do alelo G apresentarem bronquiolite grave foi 2,7 vezes maior em comparação aos pacientes AA. Além disso, observamos que houve diferença significativa ao compararmos tempo de internação e sibilância entre os pacientes do grupo BVA. Os resultados do estudo de caso-controle e a avaliação do tempo de internação no grupo BVA mostram resultados consistentes do efeito protetor do alelo A.

O conhecimento de polimorfismos genéticos de *IL-17* e sua associação com desfechos da BVA pode ter grande relevância clínica e pode direcionar as estratégias terapêuticas específicas para pacientes de alto risco para doença grave. Existe uma necessidade de mais estudos de associação genética em diversas populações com o objetivo de ampliar o conhecimento nesta área. Os resultados deste estudo sugerem que o polimorfismo de *IL-17*, rs2275913, está associado à proteção da BVA grave e pode influenciar diretamente a gravidade da bronquiolite nestas crianças.

REFERÊNCIAS

1. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: recent evidence on diagnosis and management. *Pediatrics*. 2010;125(2):342-9.
 2. Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of virology*. 2008;82(5):2040-55.
 3. Faber TE, Groen H, Welfing M, Jansen KJ, Bont LJ. Specific increase in local IL-17 production during recovery from primary RSV bronchiolitis. *Journal of medical virology*. 2012;84(7):1084-8.
 4. Braciale TJ. Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(2):141-6.
 5. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel Jr EF, Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in Medicaid. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(6):865-70.
 6. Bloemers BL, van Furth AM, Weijerman ME, Gemke RJ, Broers CJ, van den Ende K, et al. Down syndrome: a novel risk factor for respiratory syncytial virus bronchiolitis—a prospective birth-cohort study. *Pediatrics*. 2007;120(4):e1076-e81.
 7. Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *New England Journal of Medicine*. 1986;315(2):77-81.
 8. Houben M, Coenjaerts F, Rossen J, Belderbos M, Hofland R, Kimpen J, et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. *Journal of medical virology*. 2010;82(7):1266-71.
 9. Bueno SM, González PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *International immunopharmacology*. 2008;8(10):1320-9.
 10. Hurwitz JL. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Expert review of vaccines*. 2011;10(10):1415-33.
 11. DeVincenzo JP, El Saleeby CM, Bush AJ. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(11):1861-8.
 12. Miyairi I, DeVincenzo JP. Human genetic factors and respiratory syncytial virus disease severity. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(4):686-703.
 13. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly
-

- associated with innate immune genes. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(6):826-34.
14. Stoppelenburg AJ, Salimi V, Hennis M, Plantinga M, Huis R, Walk J, et al. Local IL-17A Potentiates Early Neutrophil Recruitment to the Respiratory Tract during Severe RSV Infection. *PloS one*. 2013;8(10):e78461.
 15. Mukherjee S, Lindell DM, Berlin AA, Morris SB, Shanley TP, Hershenson MB, et al. IL-17–induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. *The American journal of pathology*. 2011;179(1):248-58.
 16. Tan H-L, Rosenthal M. IL-17 in lung disease: friend or foe? *Thorax*. 2013;68(8):788-90.
 17. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(4):539-45.
 18. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *The Lancet*. 2005;366(9493):1315-23.
 19. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, et al. The international HapMap project. *Nature*. 2003;426(6968):789-96.
 20. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *Journal of clinical immunology*. 2008;28(1):44-9.
 21. Zhang X, Yu P, Wang Y, Jiang W, Shen F, Wang Y, et al. Genetic polymorphisms of interleukin 17A and interleukin 17F and their association with inflammatory bowel disease in a Chinese Han population. *Inflammation Research*. 2013;62(8):743-50.
 22. Kim SW, Kim ES, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2011;60(11):1527-36.
 23. Saraiva AM, Alves e Silva MRM, Correia Silva JdF, da Costa JE, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. *Human immunology*. 2013;74(2):207-14.
 24. Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PloS one*. 2011;6(10):e26229.
-

25. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;114(3):671-6.
 26. Zhang X, Zheng L, Sun Y, Zhang X. Analysis of the association of interleukin-17 gene polymorphisms with gastric cancer risk and interaction with *Helicobacter pylori* infection in a Chinese population. *Tumor Biology*. 2014;35(2):1575-80.
-

TABELAS/FIGURAS

Tabela 1. Dados descritivos da amostra comparando o grupo em estudo versus o grupo controle.

	BVA	Controles
	(N =121)	(N =71)
Idade em meses (média ± DP)	3,45 ± 2,61	13,10 ± 8,85
Sexo masculino, n (%)	67/121 (55,37)	27/69 (39,13)
Peso atual (Kg)	5,73 ± 2,11	8,59 ± 4,45
FR (mpm)	48,23± 14,82	-
SpO₂ na internação (%)	91,51± 18,91	-

BVA: bronquiolite viral aguda; FR: frequência respiratória; SPO₂: saturação parcial de oxigênio

Tabela 2.a) Resultados da genotipagem, frequência alélica e desvio do equilíbrio de *Hardy Weinberg* (EHW) para o SNP rs2275913.

	Observado	Esperado
Taxa de sucesso da genotipagem	99,48% (192/193)	
Homozigoto frequente GG	121	114,1
Heterozigoto AG	54	67,8
Homozigoto raro AA	17	10,1
Freq alelo raro		0,23
Significância para desvio EHW		$p = 0,005^*$

* Teste do qui-quadrado

Tabela 2.b) Resultados do desvio do equilíbrio de *Hardy Weinberg* (EHW) para o SNP rs2275913, estratificado para casos e controles.

	BVA	CONTROLES
GG	77	44
AG	37	17
AA	07	10
Significância (p) *	0,374	0,001

BVA: Bronquiolite viral aguda; *Teste do qui-quadrado

Tabela 3.a) Comparação da frequência dos genótipos entre casos e controles.

	BVA	CONTROLES	<i>p</i> *
GG	77 63,63%	44 61,97%	
AG	37 30,57%	17 23,94%	
AA	07 5,78%	10 14,08%	0,122

BVA: Bronquiolite viral aguda; *Teste do qui-quadrado

Tabela 3.b) Comparação dos genótipos utilizando um modelo recessivo (ocorrência de homozigoto AA no SNP rs2275913).

	N	%	N	%	<i>p</i> *
	BVA		CONTROLES		
GG/AG	114		61		
AA	07	5,8	10	14,1	0,047
TOTAL	121		71		

BVA: Bronquiolite viral aguda; *Teste do qui-quadrado

Tabela 4. Comparação entre variáveis de gravidade clínica do grupo BVA e a ocorrência de homozigoto AA no SNP rs2275913.

		N	Média	DP	p*
Total dias internado	GG/AG	114	6,17	3,25	
	AA	7	3,57	0,79	0,038
Total dias de uso de O₂	GG/AG	114	5,54	3,28	
	AA	7	3,14	0,69	0,057
Total dias sibilância	GG/AG	114	4,14	2,77	
	AA	7	2,14	1,67	0,019

BVA: Bronquiolite viral aguda; O₂: oxigênio; *Teste *t* de Student

CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSÕES

Neste estudo, o SNP rs2275913 de *IL-17* mostrou um efeito de proteção para BVA grave, apresentando frequência maior de homozigotos AA em pacientes do grupo controle. O risco dos pacientes portadores do alelo G apresentarem bronquiolite grave foi 2,7 vezes maior em comparação aos pacientes AA. Além disso, observamos que houve diferença significativa ao compararmos tempo de internação e sibilância entre os pacientes do grupo BVA. Os resultados do estudo de caso-controle e a avaliação do tempo de internação no grupo BVA mostram resultados consistentes do efeito protetor do alelo A.

Poucos estudos de associação genética e bronquiolite aguda ocorrem em populações de países em desenvolvimento. A maior parte dos estudos foi realizada em países desenvolvidos como a Holanda, Inglaterra, Alemanha e Finlândia, onde predomina a etnia caucasiana. De acordo com dados da dbSNP, NCBI (*HapMap*), a frequência do alelo A do SNP rs2275913 é de 6% na população de africanos, 12% nos afro-americanos e 28% nos hispânicos. Estes dados demonstram que estas populações apresentam frequência menor do alelo A protetor, sugerindo que o risco elevado nestas etnias pode estar associado à variação na *IL17*.

O conhecimento de polimorfismos genéticos de *IL-17* e sua associação com desfechos da BVA pode ter grande relevância clínica e pode direcionar estratégias terapêuticas específicas para pacientes de alto risco para a doença grave. Existe uma necessidade de mais estudos de associação genética em diversas populações com o objetivo de ampliar o conhecimento nesta área. Os resultados deste estudo sugerem que o polimorfismo de *IL-17*, rs2275913, está associado à proteção da BVA grave e pode influenciar diretamente a gravidade da bronquiolite nestas crianças.
