

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA  
DOUTORADO SAÚDE DA CRIANÇA

LIDIANE ALVES DE AZEREDO LEITÃO

**INFLUÊNCIA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO mTOR, STAT 3 E STAT 6 NA  
GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE AGUDA**

Porto Alegre

2017

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

LIDIANE ALVES DE AZEREDO LEITÃO

**INFLUÊNCIA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO mTOR, STAT 3 E STAT 6 NA  
GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE AGUDA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Duarte de Souza

Porto Alegre

2017

## Ficha Catalográfica

L533i Leitão, Lidiane Alves de Azeredo

Influência das vias de sinalização mTOR, STAT 3 E STAT 6 na gravidade da bronquiolite aguda / Lidiane Alves de Azeredo Leitão . – 2017.

059 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto.

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza.

1. mTOR. 2. STAT-3. 3. STAT-6. 4. bronquiolite. 5. via de sinalização. I. Pinto, Leonardo Araújo. II. Souza, Ana Paula Duarte de. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecários responsáveis: Marcelo Votto Texeira CRB-10/1974 e Michelângelo Viana CRB-10/1306

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

LIDIANE ALVES DE AZEREDO LEITÃO

**INFLUÊNCIA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO mTOR, STAT 3 E STAT 6 NA  
GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE AGUDA**

Tese apresentada como requisito para obtenção  
do grau de Doutora pelo Programa de Pós-  
Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da  
escola de Medicina da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em: 31 de agosto de 2017

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Marcelo Scotta

---

Dr. Tiago Fazolo

---

Prof. Dra. Fernanda Luisi- ULBRA

Porto Alegre

2017

## RESUMO

**Introdução:** a bronquiolite aguda (BA) é uma doença inflamatória das vias aéreas considerada a patologia mais comum do trato respiratório inferior na infância. Responsável por um grande número de hospitalizações em lactentes é uma das principais doenças respiratórias em todo o mundo, elevando os custos de cuidados de saúde em lactentes. Segundo dados epidemiológicos, entre 75.000 e 125.000 crianças são hospitalizadas nos Estados Unidos anualmente com infecções causadas pelo vírus sincicial respiratório (VSR), respondendo por aproximadamente 25% das pneumonias pediátricas e até 70% das internações por bronquiolite aguda (BA). As crianças com deficiência na imunidade mediada por células podem desenvolver infecções mais graves e prolongadas. A ativação das vias de sinalização mTOR, STAT-3 e STAT-6 têm sido identificadas como reguladores-chave em diferentes funções do sistema imune. O objetivo deste estudo foi investigar a relação entre a expressão gênica de mTOR, STAT-3, STAT-6 e a gravidade da BA.

**Métodos:** trata-se de um estudo de coorte onde foi incluído um grupo de lactentes de idade inferior a 12 meses, com BA, internados em um hospital terciário de Porto Alegre, Brasil. Foi coletado lavado nasofaríngeo de todos os pacientes e armazenados em solução de Trizol à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS para posterior extração de RNA e síntese de cDNA. Foram utilizados os iniciadores específicos para verificar a expressão relativa de mTOR, STAT-3 e STAT-6 por meio de PCR em tempo real. Os resultados obtidos foram correlacionados com marcadores de gravidade da BA como tempo de internação e tempo de sibilância.

**Resultados:** para a análise da expressão da proteína de sinalização mTOR e fatores de transcrição STAT-3 e STAT-6, foram incluídos 23 pacientes hospitalizados com BA. Foi realizada uma correlação geral entre os marcadores clínicos (dias de internação e dias de sibilância) e a expressão das vias de sinalização. Os dados foram estratificados de acordo com os marcadores de severidade e mostraram uma tendência para a diminuição da expressão de mTOR em pacientes com tempo de sibilância igual ou superior a 5 dias ( $r = -0,702$  e  $p = 0,024$ ). No entanto, as vias de sinalização STAT-3 e STAT-6 não foram correlacionadas com fatores de gravidade da BA quando aplicadas neste grupo de pacientes.

**Conclusão:** os fatores de transcrição são essenciais para gerar respostas imunes eficazes. O mTOR, STAT-3 e STAT-6 participam na expressão de uma variedade de genes em resposta a estímulos celulares e podem desempenhar um papel-chave na manifestação da doença. Nossos dados demonstram a diminuição da expressão de mTOR, com melhora dos marcadores clínicos de gravidade, porém outros estudos são necessários para reforçar este achado.

**Keywords:** mTOR, STAT-3, STAT-6, bronquiolite, fatores de transcrição, transdução de sinal, via de sinalização, vírus sincicial respiratório (VSR).

## ABSTRACT

**Introduction:** acute bronchiolitis (AB) is an inflammatory disease of the airways considered the most common pathology of the lower respiratory tract in childhood. Responsible for a large number of hospitalizations in infants is one of the leading respiratory diseases worldwide, raising the costs of health care in infants. According to epidemiological data, between 75,000 and 125,000 children are hospitalized in the United States each year with infections caused by respiratory syncytial virus (RSV), accounting for approximately 25% of pediatric pneumonia and up to 70% of hospitalizations for acute bronchiolitis. Children with deficiencies in cell-mediated immunity can develop more severe and prolonged infections. Activation of the mTOR, STAT-3 and STAT-6 signaling pathways have been identified as key regulators in different functions of the immune system. The aim of this study was to investigate the relationship between the gene expression of mTOR, STAT-3, STAT-6 and AB severity.

**Methods:** it is a cohort study that included a group of infants less than 12 months old with AB admitted to a tertiary hospital in Porto Alegre, Brazil. Nasopharyngeal lavage was collected from all patients and stored in Trizol solution at  $-80^{\circ}\text{C}$  at the Biomedical Research Institute (IPB) of PUCRS for subsequent extraction of RNA and cDNA synthesis. Specific primers were used to verify the relative expression of mTOR, STAT-3 and STAT-6 by means of real-time PCR. The results obtained were correlated with AB severity markers such as hospitalization time and wheezing time.

**Results:** for the analysis of expression of the mTOR signaling protein and transcription factors STAT-3 and STAT-6, 23 patients hospitalized with AB were included. A general correlation was made between clinical markers (days of hospitalization and days of wheezing) and expression of signaling pathways. Data were stratified according to severity markers and showed a trend towards decreased mTOR expression in patients with a wheezing time equal to or greater than 5 days ( $r = -0.702$  and  $p = 0.024$ ). However, the STAT-3 and STAT-6 signaling pathways were not correlated with AB severity factors when applied in this group of patients.

**Conclusion:** transcription factors are essential for generating effective immune responses. mTOR, STAT-3 and STAT-6 participate in the expression of a variety of genes in response to cellular stimuli and may play a key role in the manifestation of the disease. Our data demonstrate the decrease in mTOR expression, with improvement in clinical markers of severity, but other studies are needed to reinforce this finding.

**Keywords:** mTOR, STAT-3, STAT-6, bronchiolitis, transcription factors, signal transduction, signaling pathway, respiratory syncytial virus (RSV).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama representando a função das vias de sinalização mTOR, STAT-3 e STAT-6 na diferenciação das células T CD4. ....	16
--	----

## ARTIGO

Figura 1. Diagrama de fluxo representando a amostra utilizada para análise da expressão da proteína de sinalização mTOR. ....	52
Figura 2. Modelo de regressão linear simples e regressão logarítmica $p=0,016$ .....	55
Figura 3. Análise estratificada Grupo de pacientes VSR+ $p=0,066$ .....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Correlação geral entre a expressão das vias de sinalização de mTOR, STAT- 3 e STAT- 6 e os marcadores de severidade. N= 23 .....	29
<b>Tabela 2.</b> Correlação entre a expressão das vias de sinalização de mTOR, STAT- 3 e STAT- 6 e o grupo sibilância $\geq 5$ dias. N= 23 .....	30

## ARTIGO

<b>Tabela 1.</b> Grupo de estudo, dados descritivos da amostra.....	53
<b>Tabela 2.</b> Coeficiente de correlação entre pacientes com tempo de sibilância maior ou igual a 5 dias.....	54



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AB</b>	<i>Acute bronchiolitis</i> , bronquiolite aguda
<b>AB</b>	<i>Applied Biosystems</i>
<b>AGC</b>	<i>Camp-Dependent Protein Kinase/Protein Kinase G/Protein Kinase C Extended</i> , proteína quinase dependente do campus / Protein quinase G / Protein quinase C estendida
<b>BA</b>	Bronquiolite aguda
<b>CA</b>	Califórnia
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> , DNA complementar
<b>CT</b>	<i>Threshold cycle</i> , ciclo limiar
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
<b>DNAhs</b>	<i>Deoxyribonucleic acid high sensitivity</i> , ácido desoxirribonucleico de alta sensibilidade
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>HSL</b>	Hospital São Lucas
<b>HMPV</b>	<i>Human metapneumovirus</i> , metapneumovírus
<b>HRV</b>	<i>Human rhinovirus</i> , rinovírus humano
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IPB</b>	Instituto de Pesquisas Biomédicas
<b>JAK</b>	<i>Janus kinases</i> , janus quinases
<b>KLF2</b>	<i>Krüppel-like Factor</i> , fator de <i>Krüppel</i>
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<i>Macrophage Inflammatory Proteins alfa</i> , proteínas inflamatórias de macrófagos alfa
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	<i>Macrophage Inflammatory Proteins beta</i> , proteínas inflamatórias de macrófagos beta
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> , proteína alvo da rapamicina
<b>mTORC1</b>	<i>Mammalian Target of Rapamycin complex 1</i> , proteína alvo da rapamicina complexo 1
<b>mTORC2</b>	<i>Mammalian Target of Rapamycin complex 2</i> , proteína alvo da rapamicina complexo 2
<b>NADPH</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> , fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor kappa B</i> , fator nuclear Kappa B
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; reação em cadeia da polimerase
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i> , proteína quinase A
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i> , proteína quinase C
<b>PKG</b>	<i>Protein kinase G</i> , proteína quinase C
<b>PPP</b>	<i>Pentose phosphate pathway</i> , pentose fosfato
<b>PUC</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<b>RANTES</b>	<i>Regulated upon activation normal t cell expressed and secreted</i> , regulação da ativação das células T expressas e secretadas
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> ; ácido ribonucleico
<b>SOCS3</b>	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i> , proteínas 3 supressora da sinalização de citocinas
<b>SOCS5</b>	<i>Suppressor of cytokine signaling 5</i> , proteínas 5 supressora da sinalização de citocinas
<b>SH2</b>	<i>Src Homology 2</i> ,
<b>S727</b>	Serina 727
<b>S727A</b>	Serina 727 A
<b>SMADS</b>	<i>mothers against decapentaplegic</i>
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>STAT</b>	<i>Signal transducers and activators of transcription</i> , transdutores de sinal e ativadores de transcrição
<b>T CD8</b>	Células T citotóxicas
<b>Th1</b>	Células <i>T helper</i> 1, células T auxiliares 1
<b>Th2</b>	Células <i>T helper</i> 2, células T auxiliares 2
<b>Th17</b>	Células <i>T helper</i> 17, células T auxiliares 17
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor</i> , fator de necrose tumoral
<b>Treg</b>	<i>Regulatory T cell</i> ; células T regulatórias
<b>VSR</b>	Vírus sincicial respiratório
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitros
<b>ng</b>	Nanogramas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 BRONQUIOLITE.....	14
2.2 RESPOSTA IMUNE CONTRA O VSR .....	15
<b>2.3 mTOR (MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 STAT-3 E STAT-6 (SIGNAL TRANSDUCERS AND ACTIVATORS OF TRANSCRIPTION).....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>4 HIPÓTESE.....</b>	<b>23</b>
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	24
5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA .....	24
5.3 PROCEDIMENTOS .....	24
5.4 EXPRESSÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS .....	26
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
5.6 ÉTICA .....	27
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>36</b>
ANEXO - APROVAÇÃO CEP.....	36
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>37</b>
APÊNDICE 1 - ARTIGO ORIGINAL.....	37
APÊNDICE 2 - PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

A bronquiolite aguda (BA) é uma doença inflamatória das vias aéreas considerada a patologia mais comum do trato respiratório inferior na infância. Responsável por um grande número de hospitalizações em lactentes é uma das principais doenças respiratórias em todo o mundo, elevando os custos de cuidados de saúde em lactentes (1,2). Fatores socioeconômicos e co-morbidades tais como prematuridade, doença pulmonar crônica e cardiopatia congênita aumentam os riscos de BA severa (1).

O vírus sincicial respiratório humano (VSR), tipos A e B (família *Pneumoviridae*, no gênero *Orthopneumovirus*, ordem *Mononegavirales*) é um dos principais causadores de doenças respiratórias como a bronquiolite, responsável também por significativa morbidade e mortalidade em lactentes (3–5). Estima-se que mais de 3 milhões de hospitalizações anuais por doença respiratória e pelo menos 66.000 mortes ocorrem por ano em crianças menores de 5 anos de idade (2,6). As estratégias de tratamento contra o patógeno viral, comumente utilizadas, são limitadas. A gravidade da doença varia de um resfriado comum leve à bronquiolite, com obstrução das vias aéreas e hipoxia em lactentes (6,7). A apnéia é observada em 1-24% dos bebês infectados com VSR e a bronquiolite severa associada está relacionada a episódios subsequentes de sibilos que podem persistir até os 11 anos de idade (8).

Não existe terapêutica antiviral segura contra o VSR ou vacina já licenciada (6,9). O composto químico endovenoso ribavirina é um fármaco testado para diminuição dos sintomas das infecções, porém seu uso é limitado devido aos efeitos secundários adversos e aos riscos associados. O palivizumabe, utilizado como medida profilática é um anticorpo monoclonal neutralizante dirigido contra a glicoproteína F do vírus, podendo ser eficaz na redução das hospitalizações em pacientes com risco de doença grave (10,11). O alto custo desta imunoprofilaxia torna seu uso impraticável em países de baixa renda (9), limitando à lactentes de alto risco (crianças prematuras, com doença pulmonar crônica e portadores de cardiopatias congênitas).

A gravidade da bronquiolite pode estar relacionada com reações individuais de cada organismo. Alguns mediadores da resposta imune podem influenciar diretamente a resposta ao vírus. A infecção provoca uma inflamação dos bronquíolos, podendo ocorrer necrose das células epiteliais ciliadas bronquiolares, edema da mucosa, infiltração peribrônquica e perivascular e produção de secreção levando à obstrução dos bronquíolos. Os neutrófilos predominam no lavado nasal e broncoalveolar (LBA) em lactentes com bronquiolite aguda (12). As secreções respiratórias contêm níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (6,13,14). As citocinas, pequenas proteínas ou peptídeos, produzidos por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos e linfócitos ativados, são considerados importantes mediadores do processo inflamatório. A resposta imune contra a infecção viral também é mediada por células T. A resposta *T helper 1* (Th1) é pró-inflamatória, importante na geração de imunidade mediada especialmente pelas células T citotóxicas (T CD8), necessárias para o controle de agentes patogênicos virais. Os níveis da citocina Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), produzida pelas células Th1, também estão elevados na mucosa nasal e no tecido pulmonar dos pacientes infectados, promovendo um efeito protetor e diminuição da hipóxia (4,15,16). A comparação entre os mediadores de imunidade inata e adaptativa em aspirado nasofaríngeo (NPAs) e plasma, revela níveis de IL-2, IL-6 / IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  significativamente maiores nos pacientes com NPAs ( $p < 0,05$ ) em relação ao plasma, indicando uma predominância relativa de mediadores de imunidade inata na mucosa respiratória (15). Para Bermejo *et al*, os mediadores aumentados correspondem a citocinas Th1 (IL-2, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ), citocinas Th2 (IL-13, IL-4, IL-6, IL-10), quimiocinas (IP-10, IL-8, MIP1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), fatores de crescimento e também IL-17. Teoricamente esses mediadores pró-inflamatórios podem promover inflamação no trato respiratório e conseqüentemente contribuir para o comprometimento respiratório demonstrado por essas crianças (15). Em geral, a resposta *T helper 2* (Th2) pode estar associada a manifestações mais severas de infecção por VSR (17–19). As células *T helper 17* (Th17), atualmente, também têm se apresentado como um fenótipo importante durante a patogenia da bronquiolite (17,20,21).

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin* - mTOR) e o transdutor de sinal e ativador de transcrição (*signal transducers and activators of transcription* -STAT), especialmente STAT-3 e STAT-6 tem sido apresentados como fatores

essenciais na produção da resposta imune (22). Essas vias de sinalização são importantes reguladores no desenvolvimento, crescimento celular, funcionamento de células do sistema imunológico e desenvolvimento dos fenótipos Th2 e Th17, possivelmente importantes para a patogenia da BA (21,23). Entretanto, os mecanismos para identificar a combinação destes e a gravidade de doenças como a bronquiolite ainda precisam ser descritos. As crianças com deficiência nas células do sistema imune podem desencadear uma infecção mais grave e prolongada. Assim, dada a importância das vias de sinalização mTOR, STAT-3 e STAT-6 no sistema imune, torna-se fundamental reconhecer a relevância destas frente à infecção. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar a relação entre a expressão das vias de sinalização mTOR, STAT-3 e STAT-6 e a gravidade da bronquiolite aguda.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BRONQUIOLITE

As doenças do trato respiratório inferior constituem-se numa das principais causas de mortalidade na população pediátrica. A bronquiolite aguda (BA) é uma doença inflamatória das vias aéreas, considerada a causa mais comum de internação hospitalar nos primeiros 12 meses de vida. Períodos de grande incidência podem gerar altos índices de hospitalizações nessa faixa etária (1).

O VSR é o agente etiológico mais comum da BA. É considerado uma das principais causas de mortes relacionadas à bronquiolite e pneumonia em crianças em todo o mundo (3,4). Recentemente, Stein et al (2017), apresentou em sua revisão sistemática e meta análise, 55 estudos, provenientes de 32 países, a partir de 5274 pesquisas potencialmente relevantes. Destes, seis estudos apresentaram especificamente a incidência de hospitalização por Infecção Respiratória Aguda (IRA) em crianças prematuras com menos de 1 ano de idade e resultaram em uma estimativa global de 63,85/1000 crianças/ano (IC 95%, 37,52-109,7) (5). Byington, et al (2015), nos Estados Unidos, demonstrou que em crianças com idade inferior a 2 anos, a taxa de mortalidade foi entre 3 e 4 por 10.000 internações hospitalares. A maioria desses óbitos foi associada a internações prolongadas e pelo menos uma comorbidade (24). Segundo dados epidemiológicos, entre 75.000 e 125.000 crianças são hospitalizadas nos Estados Unidos anualmente com a infecção por VSR, respondendo por aproximadamente 25% das pneumonias pediátricas e até 70% das internações por bronquiolite (25,26). Ao estratificar os dados entre as crianças americanas nos últimos anos, com doenças relacionadas, Hall e colaboradores (7) destacaram que, cerca de 57.527 (3%) são internadas, 517.747 (25%) são tratadas em serviços de emergência e 1.534.064 (73%) são atendidas por pediatras; destes pacientes ambulatoriais, 1.256.014 (61%) têm entre 2 e 5 anos de idade. As características mais frequentemente associadas à bronquiolite incluem a predominância do sexo masculino, condições médicas coexistentes, status socioeconômico mais baixo, exposição à fumaça, falta de amamentação e contato com outras crianças (27). Infelizmente, não dispomos de vacinas e tratamentos eficazes

para o vírus até o presente momento. Embora nenhuma vacina tenha sido alcançada, os avanços na imunologia e virologia molecular, diante da compreensão da patologia e patogênese da bronquiolite sugerem que uma vacina está ao alcance em um futuro breve (2,28).

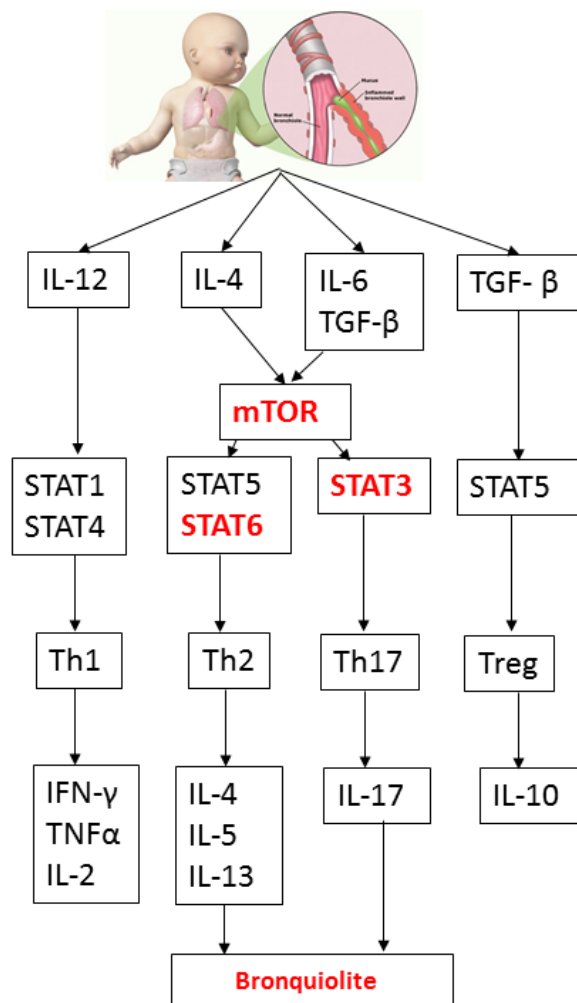
## 2.2 RESPOSTA IMUNE VIRAL

A resposta imune frente à infecção é caracterizada pela inflamação significativa e pode contribuir para a patogênese da doença, particularmente quando bronquíolos e vias aéreas superiores ficam obstruídos com células inflamatórias e secreção. A bronquiolite induz a secreção de várias quimiocinas, incluindo *Regulated Upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES), *Macrophage Inflammatory Proteins Alfa* (MIP-1 $\alpha$ ), *Macrophage Inflammatory Proteins Beta* (MIP-1 $\beta$ ) e Interleucina 8 (IL-8), que recrutam um grande número de células imunes para os locais de infecção (14,26,29,30). O recrutamento de neutrófilos para vias aéreas pode mediar diretamente a destruição de células infectadas (15,16,30).

As citocinas são moléculas proteicas que modulam a função de outras células, estimulando, modulando ou inibindo diferentes células do sistema imunológico ou da própria célula produtora. São produzidas por diferentes tipos celulares, mas principalmente por linfócitos e macrófagos ativados, sendo importantes para o controle da resposta imune (13,20,31). Os linfócitos T CD4 ativados secretam citocinas que promovem o crescimento, diferenciação e funções de linfócitos B, macrófagos e outras células. Os linfócitos T CD4 são definidos em diferentes fenótipos dependendo do tipo de citocinas que secretam: Th1 (*T helper 1*), Th2 (*T helper 2*), Th17 (*T helper 17*) e Treg (células T regulatórias) (32). O processo de diferenciação de células T CD4 é regulado e controlado por redes de citocinas, fatores de transcrição e modificações epigenéticas. As citocinas que induzem a diferenciação das células são a IL-12 (via STAT-1/STAT-4) para as células Th1, IL-4 (via STAT-5/STAT-6) para as células Th2, *Transforming Growth Factor Beta* (TGF $\beta$ ) /IL-6 (via STAT-3) para Th17 e TGF $\beta$  (via STAT-5) para Treg (4,17,22). As células também poderão diferenciar-se através do padrão de resposta após ativação (18) e mais recentemente outros fatores foram descritos auxiliando nesta diferenciação, como a ativação do mTOR (22,33). Delgoffe *et al* demonstraram que a deficiência de mTOR em células T correlaciona-se com a diminuição da ativação dependente de citocinas de STAT4, STAT3 e STAT6. Consequentemente, as células T CD4 deficientes em mTOR não foram capazes de diferenciar-se em células efetoras Th1, Th17 ou Th2 sob



condições estimulantes específicas e distorcidas em relação à diferenciação celular T reguladora (Treg) (34). As células Th1 produzem citocinas relacionadas principalmente com a defesa mediada por fagocitose como  $\text{INF-}\gamma$ , IL-2 e *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) (35). As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, relacionadas com a produção de anticorpos Imunoglobulina E (IgE) e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra alérgenos (18,19). As células Th17 produzem IL-17 e estão relacionadas com o aumento de inflamação e autoimunidade (36). A IL-17 desempenha um papel no aumento da produção de muco nos brônquios de crianças com infecção por VSR (15,37). Já as células Treg são importantes para o controle da resposta imune produzindo citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (21,38) (Figura 1).



**Figura 1.** Diagrama representando a função das vias de sinalização mTOR, STAT-3 e STAT-6 na diferenciação das células T CD4.

A desregulação da resposta imune frente a patógenos respiratórios pode levar à doenças pulmonares promovendo a diminuição da função pulmonar (39,40). Para Fulton, *et al* as Tregs são essenciais na regulação da resposta imune adaptativa diminuindo a inflamação espontânea nos pulmões (17,40). Pouco se sabe sobre o papel das Tregs durante as infecções virais agudas onde coordenam o recrutamento precoce de células T CD8 específicas de vírus para o tecido pulmonar e vias aéreas. As células T CD8 desempenham um papel protetor importante tanto na depuração viral como na imunopatologia gerando moléculas imunocompetentes (4,41). Durante a infecção viral, o processo inflamatório está diretamente associado ao desequilíbrio imunológico promovendo assim, um aumento na resposta Th2 (19,38). Vários fatores coordenam a função e diferenciação destes linfócitos durante a infecção viral, dentre eles destacamos as vias de sinalização mTOR, STAT- 3 e STAT- 6.

### **2.3 mTOR** (*mammalian target of rapamycin*)

O mTOR é uma proteína quinase (serina / treonina), possui uma função de sensor molecular do metabolismo e homeostase celular integrando os sinais ambientais e alterando os processos metabólicos e celulares (7,27,42). O mTOR forma a subunidade catalítica de dois complexos proteicos distintos, são eles mTOR Complex 1 (mTORC1) e mTOR Complex 2 (mTORC2) (23). A ativação de mTORC1 raramente ocorre isoladamente e coopera com muitos outros eventos de sinalização para alterar a fisiologia celular (43). O mTORC1 promove a transcrição de genes envolvidos na glicólise, a via da Pentose Fosfato (PPP) e de novolipogênese induzindo a glicose 6-phosphate desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase. A fim de promover a redução de energia para a síntese de nucleotídeos necessários para replicação do *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), o mTORC1 aumenta o fluxo através da PPP oxidativa para gerar Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida (NADPH), contribuindo para a promoção do crescimento e proliferação de células anabólicas, quando as condições são favoráveis ou autofagia, quando desfavoráveis (43,44). Enquanto mTORC1 regula o crescimento celular e metabolismo, o mTORC2 atua controlando a proliferação e sobrevivência celular, principalmente pela fosforilação de vários membros da família de proteínas quinases (AGC- *Camp-Dependent Protein Kinase* /*Protein Kinase G*/*Protein Kinase C Extended*,- PKA- Proteína-quinase A, PKG- Proteína-quinase G, PKC- Proteína-quinase C). O mTORC2 é caracterizado pela sua insensibilidade ao tratamento agudo com rapamicina. Em vez de Raptor, contudo, mTORC2 contém Rictor (insensível à rapamicina)

(45,46). O mTORC1 é sensível à rapamicina e promove a continuidade celular. Tanto mTORC1 como mTORC2 são necessários para a produção da resposta Th1, através de *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) e STAT4. Além disso, o mTORC1 é importante para ativação das células Th17 através de SOCS3 e STAT-3. Assim, apenas o mTORC2 é necessário para o desenvolvimento de Th2, através de *Krüppel-like factor* (KLF2), *suppressor of cytokine signaling 5* (SOCS5) e STAT-6. A inativação de ambos mTORC1 e mTORC2 favorece o desenvolvimento de células Treg (14,17).

Estudos de inibição com rapamicina sugerem que mTORC1 bloqueia o desenvolvimento de células T CD8 de memória (44,47). Muitos aspectos da função mTOR e da regulação têm sido apenas elucidados recentemente, porém algumas questões permanecem sem resposta (46). Para Nascimento *et al* (2016), durante a infecção viral, o tratamento com rapamicina nas células dendríticas afeta parcialmente sua capacidade para diferenciar as células T CD8, mantendo as moléculas co-estimulatórias e aumentando a replicação do vírus (45). Souza e colaboradores (2016) apresentaram a hipótese de que a ativação de mTOR é um mecanismo de virulência empregado para diminuir a atividade de células T CD8, especialmente no compartimento de memória. Além disso, investigou se a infecção por VSR modula mTOR em células T CD8. Os dados demonstraram que o vírus induz a fosforilação de mTOR e a expressão do gene mTOR aumenta significativamente, em secreções nasais de pacientes infectados com VSR, em comparação com lactentes não infectados, indicando o papel de mTOR durante a replicação do VSR (48). Entretanto, a relação entre mTOR, STAT-3 e STAT-6 correlacionados com os diferentes fenótipos de células T CD4, especialmente Th2 e Th17, durante a bronquiolite não está ainda bem elucidada.

#### **2.4 STAT-3 E STAT-6** (*signal transducers and activators of transcription*)

Os fatores de transcrição são proteínas intracelulares que se ligam a sequências gênicas reguladoras, promovem alteração da função celular resultando em aumento ou redução da síntese proteica. O excesso de ativação dos fatores de transcrição pode ser responsável por prolongada liberação de citocinas inflamatórias nas doenças respiratórias. O processo de ativação é complexo, podendo ser ativados por ligantes ou serem ativados dentro do citoplasma, expondo os sinais de localização nuclear (49,50). O controle transcricional é o resultado de uma ação mútua entre sequências regulatórias do DNA (promotores, estimuladores e silenciadores) e as sequências específicas que se ligam a essas proteínas, estas recebem a denominação de

fatores de transcrição. Os fatores de transcrição atuam então como mensageiros nucleares que transferem informações da superfície da célula e do citoplasma para o núcleo. A ativação do fator de transcrição é complexa e pode envolver múltiplas vias de transdução de sinais intracelulares, incluindo quinases como *Janus kinases* (JAKs), que se associam a diferentes subunidades de receptores de citocinas nos complexos receptores da superfície celular e ativam as STATs (22).

As STATs são consideradas uma família de proteínas citoplasmáticas ativadas para participar no controle de genes quando as células encontram vários polipeptídios extracelulares (51). O transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT-3) e 6 (STAT-6) são membros de uma família de sete proteínas (STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT- 5a, STAT-5b e STAT-6) que retransmitem sinais da citocina ativada e receptores do fator de crescimento, dimerizam, formam complexos multiprotéicos e translocam-se para o núcleo, onde regulam a transcrição de genes (41,43,52,53). As proteínas STATs também podem ser fosforiladas nos seus terminais C nos resíduos de serina, mais frequentemente em Serina 727 (S727). O processo de fosforilação da serina aumenta a atividade do fator de transcrição STAT, e as linhas celulares com uma mutação serina 727A (S727A) têm anulado a atividade transcricional (52). A fosforilação da serina também pode servir para diminuir a fosforilação da tirosina no caso de STAT-3, quer através da inibição ou desfosforilação, embora o mecanismo ainda não esteja completamente descrito. Assim, enquanto STATs compartilham a dupla função de transdutores de sinal e ativadores de transcrição, com outros mediadores intracelulares de respostas de citocinas como *Mothers Against Decapentaplegic* (SMADs), *Nuclear Factor Kappa B* (NF $\kappa$ B) ou *Translocation Associated Notch Homolog* (Notch) o mecanismo de conversão de STATs de proteínas citoplasmáticas em suas formas ativas é único. Esta singularidade deriva de dois componentes estruturais não encontrados em outras famílias de fatores de transcrição: um domínio *Src Homology 2* (SH2) e um resíduo de tirosina C- terminal que se torna fosforilado em células estimuladas com citocinas, mais frequentemente por JAKs associadas a receptores (52,54).

Assim, podemos considerar que as vias de sinalização STAT-3 e STAT-6 são descritas como fatores de transcrição em resposta à ativação de diversas citocinas e de receptores de fatores de crescimento. As STAT-3 e 6 exercem um papel fundamental na modulação da transcrição e no controle dos processos celulares de uma variedade de genes envolvidos em processos críticos como o crescimento, proliferação, diferenciação celular, sinalização química,

angiogênese, metástase, respostas imunes e apoptose dentro da célula (2,26,27). Johnston *et al* reforça que, em muitos cânceres, níveis elevados de STAT-3 foram associados a um mau prognóstico (55,56).

Como mencionado anteriormente a STAT-3 participa da diferenciação das células Th17 (57), já STAT-6, potencialmente induzido pela IL-4, impulsiona a diferenciação de Th2. Delgoffe e colaboradores (34) demonstraram que a deficiência de mTOR em células T está relacionada com a diminuição da ativação dependente de citocinas de STAT-3, STAT-4 e STAT-6. Conseqüentemente, as células T CD4 *naïve* deficientes em mTOR foram incapazes de diferenciar-se em células efetoras Th1, Th2 ou Th17 sob condições estimulatórias específicas na diferenciação das Tregs. Nesse processo, parece que a via mTOR integra diversos sinais ambientais nas células T e controla o comprometimento da linhagem de células T através da modulação da ativação de STATs específicas (22,34)

Um modelo experimental de sepse grave seguido de infecção por vírus sincicial respiratório (VSR), foi criado para observar a imunopatologia exacerbada nos pulmões de camundongos (aumento da produção de muco nos pulmões) em comparação com camundongos de cirurgia simulada (com o aumento da produção de IL-17 nos pulmões infectados). O objetivo do estudo foi identificar se os camundongos imunocomprometidos exibiam modulações em resposta à infecção das vias aéreas. Os resultados indicaram que os animais pós-sépticos apresentavam uma suscetibilidade aumentada à infecção viral com aumento da carga viral nos pulmões e uma produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (como a IL-17). Além disso, as células T CD4 +, de camundongos pós-sépticos, produziram níveis aumentados de IL-17. Curiosamente, este aumento na produção de IL-17 parece dependente de STAT-3. STAT-3 desempenha um papel importante na iniciação da transcrição do gene IL-17, e os sinais dependentes de STAT-3 (tais como a sinalização do receptor de IL-6) desempenham um papel importante no desenvolvimento de células T CD4 produtoras de IL-17 (35).

A resposta inflamatória do hospedeiro promove o recrutamento de células imunológicas necessárias para o processo de eliminação do vírus, provocando danos teciduais. Reconhecer os mecanismos de controle da inflamação no local da infecção é fundamental para a diminuição dos sintomas e exacerbação de doenças respiratórias. Dentro deste contexto destacamos as vias

de sinalização mTOR, STAT-3 e STAT-6. A relação entre mTOR, STAT-6 e STAT-3 durante a bronquiolite e sua associação com a gravidade não estão ainda bem descritas. A elucidação deste mecanismo é importante para melhor compreensão da patogenia da doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência da proteína de sinalização mTOR sobre a gravidade da bronquiolite aguda em lactentes;
- Investigar a relação entre a expressão dos fatores de transcrição STAT-3 e STAT-6 e a gravidade da bronquiolite.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão de mTOR, STAT-3 e STAT-6, por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real nas amostras de lavado nasal dos pacientes hospitalizados com bronquiolite aguda no primeiro ano de vida;
- Testar o efeito da associação da expressão de mTOR, STAT-3 e STAT-6 e os marcadores de gravidade: tempo de internação e tempo de sibilância;
- Associar a expressão dos marcadores mTOR, STAT-3 e STAT-6 a partir da análise estratificada por gravidade (acima de 5 dias de internação e < de 5 dias de internação).

#### **4 HIPÓTESE**

A variabilidade da infecção pode estar associada à diferença na expressão dos marcadores inflamatórios, imunológicos e fatores genéticos. A resposta ao vírus pode ser um fator relevante na determinação da gravidade da BA. As crianças com deficiência nas células do sistema imune podem desencadear uma infecção mais grave e prolongada. Assim, torna-se fundamental, reconhecer a relevância do sistema imune no combate à infecção. Dentro deste contexto o mTOR, STAT-3 e STAT-6 além de controlar diferentes funções celulares, também atuam na diferenciação das células Th2 e Th17 que são importantes durante a bronquiolite aguda. A correlação da expressão destes fatores com a gravidade da BA pode revelar novos marcadores e elucidar sobre sua participação na patogenia da BA.



## 5 METODOLOGIA

### 5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo é uma análise secundária e retrospectiva de uma coorte de lactentes com bronquiolite aguda.

### 5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

No presente estudo foi incluído um grupo de lactentes em um hospital terciário com diagnóstico de BA em Porto Alegre, Brasil, com idade inferior a 12 meses. Os critérios de inclusão utilizados foram: 1. Pacientes internados em enfermaria ou sala de observação, pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS) com entrada na emergência pediátrica, de setembro de 2009 a setembro de 2011; 2. Pacientes com suspeita clínica de BA (primeiro episódio de sibilância, acompanhado de infecções de vias aéreas superiores); 3. Lactentes menores de 12 meses de idade.

Os critérios de exclusão compreenderam: histórico de doenças pulmonares relacionadas à prematuridade (displasia bronco-pulmonar); cardiopatias; doenças pulmonares crônicas e uso de corticoides (sistêmicos ou inalatórios).

### 5.3 PROCEDIMENTOS

Após a inclusão do paciente no estudo, foram coletados os dados referentes às condições clínicas do paciente, obtidos no momento da admissão hospitalar, sinais vitais e parâmetro ventilatório (sinais de dificuldade respiratória). Estas informações foram extraídas dos prontuários. A história clínica foi coletada através dos pais ou responsável, por meio de um questionário padronizado. As informações sobre o curso clínico da doença até a alta, como duração da internação hospitalar e tempo de sibilância foram coletadas pelos médicos e

pesquisadores do estudo assim como as variáveis demográficas. A variável sibilância foi avaliada a partir da ausculta diária realizada pelos pesquisadores durante o estudo.

### **Coleta e armazenamento de amostras**

O protocolo de internação incluiu isolamento respiratório e coleta de secreção nasofaríngea de todos os pacientes com BA. A coleta de amostras e a imunofluorescência direta (ID) são rotina na avaliação de crianças com bronquiolite neste hospital. O lavado nasofaríngeo foi armazenado em solução de TRIzol à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB-PUC) para posterior extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). O cDNA foi utilizado para identificação do vírus sincicial respiratório (VSR) através das reações de PCR em tempo real quantitativo para amplificar genes específicos do vírus, utilizando 4 ng de cDNA em triplicata para cada paciente (58), e para a dosagem de expressão de mTOR, STAT-3 e STAT-6.

### **Análise por PCR em tempo real**

A extração de RNA total foi realizada pelo método de TRIzol (*Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit Superscript III (*Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*). As amostras foram incubadas a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 min, utilizando o termociclador, PTC-100™, (*MJ Research, Canada, EUA*). Após esse procedimento 10µl de *first-strand reaction mix* foram acrescentados e 2µl de SuperScript III/RNase out enzyme mix. As amostras foram incubadas novamente por  $25^{\circ}\text{C}$  durante 10 min,  $50^{\circ}\text{C}$  por 50 min, e  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Posteriormente, foram realizadas a quantificação das amostras de cDNA com o Kit *Deoxyribonucleic acid high sensitivity* (DNAhs) Qubit (*Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*). A qualidade do cDNA para cada amostra foi testada por amplificação do gene constitutivo  $\beta$ -actina, utilizando sistema de PCR em Tempo Real StepOne™, *TaqMan Universal PCR Master Mix*- catálogo 4304437 e iniciadores específicos (*Applied Biosystems-AB, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*). As amostras que não amplificaram para  $\beta$ -actina foram excluídas do estudo. As amostras foram guardadas em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.4 EXPRESSÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

O cDNA extraído foi utilizado para o estudo da expressão relativa de mTOR, STAT-3 e STAT-6 usando primers e sondas específicos do sistema TaqMan (*Applied Biosystems-AB, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*) (Hs00234508\_m1 (mTOR), Hs01047580\_m1 (STAT-3) e Hs 00598625\_m1 (STAT-6)). O controle constitutivo utilizado como normalizador foi o gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH) Hs03929097\_g1 e a  $\beta$ -actina (ACTB) Hs01060665\_g1.

A quantificação da expressão de genes foi realizada utilizando StepOne™ para PCR em tempo real (*Applied Biosystems-AB, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*). A expressão relativa foi determinada através do método do ciclo delta limiar ( $\Delta$ -CT). O valor de delta foi calculado subtraindo-se o valor de CT (*Threshold cycle*) de  $\beta$ -actina e GAPDH a partir do valor de CT para mTOR, STAT-3 e STAT-6 de cada uma das amostras.

#### 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A gravidade da doença foi avaliada pelo tempo de internação e tempo médio de sibilância. A análise estatística inclui a amostra do estudo, constituída pelo grupo de crianças com bronquiolite. Conforme a distribuição das variáveis, a análise foi descritiva utilizando testes de proporções, descrições em média (desvio padrão- DP) e mediana (intervalo interquartil- IC). Associações entre variáveis categóricas e desfechos contínuos (comparação dos marcadores de gravidade clínica) foram analisadas pelo teste t de *Student* seguido por um pós-teste de Bonferroni. As principais variáveis do estudo foram avaliadas através do teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados categóricos foram apresentados em frequência absoluta e relativa. O coeficiente de correlação de *Spearman* foi utilizado para correlacionar os dados não-paramétricos. As análises foram realizadas com os programas *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 17.0) e o software *GraphPad Prism* (*San Diego, CA, EUA*). Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0.05$ .

Foi ainda realizada análise estratificada por gravidade (acima de 5 dias de internação e < de 5 dias de internação).

## 5.6 ÉTICA

O consentimento, para a realização da pesquisa, foi obtido junto ao responsável legal da criança, sujeito da pesquisa, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A autorização da participação do paciente ocorreu antes de qualquer procedimento. A identidade de todos os participantes da pesquisa foi mantida em sigilo. As informações clínicas e os resultados individuais dos estudos são confidenciais e só poderão ser utilizadas para os objetivos descritos no TCLE. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, porém a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. As amostras de sangue ou cDNA foram armazenadas apenas com seu registro, sem o nome ou iniciais. Somente os pesquisadores poderão identificar a origem das amostras. O Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS poderá ter acesso aos dados da pesquisa para poder assegurar que seus direitos estão sendo protegidos. A pesquisa foi iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS.

## 6 CONCLUSÃO

As vias de sinalização são essenciais para geração de respostas imunes eficazes (22). Existe evidência de que as vias mTOR e STAT apresentam um mecanismo de regulação mútuo, induzindo ou suprimindo a sua ativação em vários tipos de células imunitárias. No entanto, vários dos mecanismos propostos ainda precisam ser confirmados e a sequência de eventos precisa ser definida, especialmente durante a bronquiolite viral. Nossos resultados, todavia demonstraram que as vias de sinalização STAT-3 e STAT-6 apesar de ter uma grande importância na regulação da resposta imune não apresentaram nenhuma associação com os fatores de gravidade estudados neste grupo de pacientes hospitalizados. Entretanto, torna-se relevante ressaltar que a expressão da proteína de sinalização mTOR, no lavado nasal de pacientes internados com mais de 5 dias de sibilância, correlacionou negativamente com este marcador de gravidade: tempo de sibilância. Estes dados sugerem que pacientes que sibilaram mais, conseqüentemente durante manifestações mais severas da bronquiolite, apresentaram menor expressão da proteína mTOR. Acreditamos que, possivelmente, o mTOR diminuído possa estar contribuindo com maior replicação viral, já demonstrado em estudos onde o uso da rapamicina diminuiu mTOR, aumentando a replicação de VSR (45,58). A diminuição dos níveis da proteína de sinalização mTOR nas células T está correlacionada com a melhora na resposta CD8 de memória, contudo, no presente estudo, não estamos avaliando mTOR nas células T e sim no lavado nasal total. Assim, mais estudos são necessário para avaliar o real mecanismo associado com a expressão de mTOR e aumento na severidade dos pacientes com bronquiolite viral aguda.

**Tabela 1.** Correlação geral entre a expressão das vias de sinalização de mTOR, STAT- 3 e STAT- 6 e os marcadores de severidade. N= 23

	<b>Dias int</b>		<b>Dias sib</b>	
	r	p	r	p
<b>STAT3</b>	-,226	,324	,184	,425
<b>STAT6</b>	,238	,298	,110	,635
<b>mTOR</b>	,013	,953	-,090	,689

\*. A correlação é significativa ao nível de 0,05 (2-tailed).

\*\*. A correlação é significativa ao nível de 0,01 (2-tailed).

**Tabela 2.** Correlação entre a expressão das vias de sinalização de mTOR, STAT- 3 e STAT-6 e o grupo sibilância  $\geq 5$  dias. N= 23

	<b>Dias int</b>		<b>Dias sib</b>	
	r	p	r	p
<b>STAT3</b>	-,182	,592	-,334	,316
<b>STAT6</b>	,247	,464	-,100	,770
<b>mTOR</b>	-,045	,901	-,702	,024*

\*. A correlação é significativa ao nível de 0,05 (2-tailed).

\*\*.. A correlação é significativa ao nível de 0,01 (2-tailed).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wainwright C. Acute viral bronchiolitis in children- a very common condition with few therapeutic options. *Paediatr Respir Rev.* 2010 Mar;11(1):39–45.
2. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010 May;375(9725):1545–55.
3. Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Jan 30;30(1):277–319.
4. Russell CD, Unger stefan a, Walton M, Schwarze J. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Apr;30(2):481–502.
5. Stein RT, Bont LJ, Zar H, Polack FP, Park C, Claxton A, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol.* 2017 Apr;52(4):556–69.
6. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Curr Opin Virol.* 2017;13(6):117–22.
7. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. *N Engl J Med.* 2009 Feb 5;360(6):588–98.
8. Ralston S, Hill V. Incidence of Apnea in Infants Hospitalized with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis: A Systematic Review. *J Pediatr.* 2009 Nov;155(5):728–33.
9. Higgins D, Trujillo C, Keech C. Advances in RSV vaccine research and development – A global agenda. *Vaccine.* 2016 Jun;34(26):2870–5.
10. Committee on Infectious Diseases. Modified Recommendations for Use of Palivizumab for Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infections. *Pediatrics.* 2009 Dec 1;124(6):1694–701.
11. Hu J, Robinson JL. Treatment of respiratory syncytial virus with palivizumab: a systematic review. *World J Pediatr.* 2010 Nov 16;6(4):296–300.
12. Yang H, Wang X, Zhang Y, Liu H, Liao J, Shao K, et al. Modulation of TSC-mTOR signaling on immune cells in immunity and autoimmunity. *J Cell Physiol.* 2013 Jun;229(1).
13. Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: *Patologia estrutural e funcional 6ª edição.* Guanabara. Rio de Janeiro; 2000. p. 45–78.
14. F. Rosenberg H, B. Domachowske J. Inflammatory Responses to Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection and the Development of Immunomodulatory



- Pharmacotherapeutics. *Curr Med Chem*. 2012 Apr 1;19(10):1424–31.
15. Bermejo-martin JF, Garcia-arevalo MC, Lejarazu RO De, Ardura J, Eiros JM, Alonso A, et al. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. 2007;18(September):162–7.
  16. Semple MG, Dankert HM, Ebrahimi B, Correia JB, Booth JA, Stewart JP, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infants is associated with reduced airway interferon gamma and substance P. 2007;(10):1–8.
  17. Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol*. 1996 May;70(5):2852–60.
  18. Caballero MT, Serra ME, Acosta PL, Marzec J, Gibbons L, Salim M, et al. TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization. *J Clin Invest*. 2015 Feb;125(2):571–82.
  19. Gut W, Pancer K, Abramczuk E, Cześćik A, Dunal-Szczepaniak M, Lipka B, et al. RSV respiratory infection in children under 5 y.o.--dynamics of the immune response Th1/Th2 and IgE. *Przegl Epidemiol*. 2013;67(1):17–22, 105–9.
  20. ACG D. *Semiologia imunológica Nutricional*. In: *Mediadores imunológicos*. Axcel Book. Rio de Janeiro; 2003. p. 22–36.
  21. Mangodt TC, Herck MA Van, Nullens S, Ramet J, Dooy J De, Jorens PG, et al. The role of Th17 and Treg responses in the pathogenesis of RSV infection. *Pediatr Res*. 2015;78(5):483–91.
  22. Saleiro D, Plataniias LC. Intersection of mTOR and STAT signaling in immunity. *Trends Immunol*. 2015 Jan;36(1):21–9.
  23. Morita M, Gravel S-P, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, et al. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle*. 2015 Feb 16;14(4):473–80.
  24. Byington CL, Wilkes J, Korgenski K, Sheng X. Respiratory Syncytial Virus-Associated Mortality in Hospitalized Infants and Young Children. *Pediatrics*. 2015 Jan 1;135(1):e24–31.
  25. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr*. 143(5 Suppl):S112-7.
  26. Dickey LL, Duncan JK, Hanley TM, Fearn R. Decapping protein 1 phosphorylation modulates IL-8 expression during respiratory syncytial virus infection. *Virology*. 2015 Jul;481:199–209.
  27. Von Linstow M-L, Høgh M, Nordbo SA, Eugen-Olsen J, Koch A, Høgh B. A community study of clinical traits and risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus infection during the first year of life. *Eur J Pediatr*. 2008 Oct

- 3;167(10):1125–33.
28. Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine*. 2013 Apr;31(SUPPL2):B209–15.
  29. Noah TL, Ivins SS, Murphy P, Kazachkova I, Moats-staats B, Henderson FW. Chemokines and Inflammation in the Nasal Passages of Infants with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Clin Immunol*. 2002;104(1):86–95.
  30. Zhang Y, Luxon BA, Casola A, Garofalo RP, Jamaluddin M, Brasier AR. Expression of Respiratory Syncytial Virus-Induced Chemokine Gene Networks in Lower Airway Epithelial Cells Revealed by cDNA Microarrays. *J Virol*. 2001;75(19):9044–58.
  31. Roit I; Brostoff J; Male D. *Imunologia*. In: Manole, editor. São Paulo; 1999. p. 1–11.
  32. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;(1):445–89.
  33. Pollizzi KN, Powell JD. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends Immunol*. 2015 Jan;36(1):13–20.
  34. Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, Heikamp E, Meyers DJ, Horton MR, et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol*. 2011 Apr 27;12(4):295–303.
  35. Mukherjee S, Allen RM, Lukacs NW, Kunkel SL, Carson WF. STAT3-mediated IL-17 production by postseptic T cells exacerbates viral immunopathology of the lung. *Shock*. 2012 Nov;38(5):515–23.
  36. Knosp CA, James A. Regulation of CD 4 + T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology*. 2011;101–11.
  37. Hashimoto K, Durbin JE, Zhou W, Sheller JR, Goleniewska K, Neal JFO, et al. Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT1 results in airway dysfunction , airway mucus , and augmented IL-17 levels. *J allergy clin immunol*. 2005;116(3):550–7.
  38. Christiaansen AF, Syed M a, Ten Eyck PP, Hartwig SM, Durairaj L, Kamath SS, et al. Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants. *Pediatr Res*. 2016 Nov 21;80(5):702–9.
  39. Yecies JL, Manning BD. Transcriptional Control of Cellular Metabolism by mTOR Signaling. *Cancer Res*. 2011 Apr 15;71(8):2815–20.
  40. Fulton RB, Meyerholz DK, Varga SM. Foxp3+ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol*. 2010 Aug 15;185(4):2382–92.
  41. Liu J, Ruckwardt TJ, Chen M, Nicewonger JD, Johnson TR, Graham BS. Epitope-Specific Regulatory CD4 T Cells Reduce Virus-Induced Illness while Preserving CD8

- T-Cell Effector Function at the Site of Infection. *J Virol.* 2010 Oct 15;84(20):10501–9.
42. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell.* 2006 Feb;124(3):471–84.
  43. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, et al. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Mol Cell.* 2010 Jul;39(2):171–83.
  44. Perl A. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Jun;1346(1):33–44.
  45. do Nascimento de Freitas D, Gassen RB, Fazolo T, Souza APD de. Rapamycin increases RSV RNA levels and survival of RSV-infected dendritic cell depending on T cell contact. *Toxicol Vitro.* 2016 Oct;36:114–9.
  46. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017 Apr;169(2):361–71.
  47. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature.* 2009 Jul 2;460(7251):108–12.
  48. de Souza APD, de Freitas DN, Antunes Fernandes KE, D’Avila da Cunha M, Antunes Fernandes JL, Benetti Gassen R, et al. Respiratory syncytial virus induces phosphorylation of mTOR at ser2448 in CD8 T cells from nasal washes of infected infants. *Clin Exp Immunol.* 2016 Feb;183(2):248–57.
  49. Srinivasa BT, Fixman ED, Ward BJ. Inhibition of STAT6 during vaccination with formalin-inactivated RSV prevents induction of Th2-cell-biased airway disease. *Eur J Immunol.* 2014 Aug;44(8):2349–59.
  50. Tahara T, Streit U, Pelish HE, Shair MD. STAT3 Inhibitory Activity of Structurally Simplified Withaferin A Analogues. *Org Lett.* 2017 Apr 7;19(7):1538–41.
  51. Darnell Jr. JE. STATs and Gene Regulation. *Science* (80- ). 1997 Sep 12;277(5332):1630–5.
  52. Quesnelle KM, Boehm AL, Grandis JR. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J Cell Biochem.* 2007 Oct 1;102(2):311–9.
  53. Darnell J, Kerr I, Stark G. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* (80- ). 1994 Jun 3;264(5164):1415–21.
  54. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene.* 2000 May 25;19(21):2628–37.
  55. Leeman RJ, Lui VWY, Grandis JR. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2006 Mar 27;6(3):231–41.
  56. Johnston PA, Grandis JR. STAT3 SIGNALING: Anticancer Strategies and Challenges. *Mol Interv.* 2011 Feb 1;11(1):18–26.

57. Li P, Spolski R, Liao W, Leonard WJ. Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells. *Immunol Rev.* 2014 Sep;261(1):141–56.
58. Souza APD de, Leitao LA de A, Luisi F, Souza RG, Coutinho SE, Silva JR da, et al. Lack of association between viral load and severity of acute bronchiolitis in infants. *J Bras Pneumol.* 2016 Aug;42(4):261–5.

ANEXO

## ANEXO - APROVAÇÃO CEP



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-834/09

Porto Alegre, 13 de julho de 2009.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 09/04678 intitulado **"Avaliação da resposta a azitromicina em lactentes com bronquiolite por vírus sincicial respiratório e dos fatores associados à gravidade da doença"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Goldim  
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.  
Dr. Renato Tetelbom Stein  
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000  
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)

## APÊNDICE

### APÊNDICE 1 - ARTIGO ORIGINAL

#### **Associação da expressão de mTOR e os marcadores de sibilância em lactentes.**

#### RESUMO

**Introdução:** a infecção do trato respiratório inferior constitui a doença mais prevalente em crianças durante os primeiros anos de vida. Durante a infecção viral, o processo inflamatório está diretamente associado ao desequilíbrio imunológico. Estudos revelam que a proteína de sinalização mTOR desempenha um papel importante no contexto da bronquiolite aguda (BA). Assim, torna-se fundamental, reconhecer a relevância do sistema imune e do mTOR no combate à infecção. O objetivo deste estudo foi investigar a relação entre a expressão mTOR e a gravidade da bronquiolite aguda em lactentes.

**Métodos:** foi realizado um estudo de coorte a partir de um grupo de lactentes internados em um hospital terciário com BA em Porto Alegre, Brasil, com idade inferior a 12 meses. O protocolo de internação incluiu isolamento respiratório e coleta de secreção nasofaríngea de todos os pacientes com BA. O lavado nasofaríngeo foi utilizado para posterior extração de RNA e síntese de cDNA utilizado para o estudo da expressão da proteína de sinalização mTOR. Os marcadores de gravidade utilizados foram: tempo de internação e tempo médio de sibilância, medidos em dias. A pesquisa foi realizada após consentimento, obtido junto ao responsável legal da criança.

**Resultados:** foram incluídos 56 pacientes com BA. Para a análise final do estudo e expressão da proteína de sinalização mTOR, 23 pacientes participaram da pesquisa. A média de idade dos pacientes com BA foi de 3,5 meses. A distribuição na variável sexo foi de 56,5% para o sexo masculino. Os marcadores de gravidade foram relacionados com a expressão da proteína de sinalização mTOR. A proteína de sinalização mTOR foi medida e analisada em cada uma das variáveis respectivamente. Os dados foram estratificados de acordo com os marcadores de severidade e mostraram uma tendência para a diminuição da expressão de mTOR em pacientes com tempo de sibilância igual ou superior a 5 dias ( $r -0,702$  e  $p 0,024$ ).

**Conclusão:** os fatores de transcrição são essenciais para gerar respostas imunes eficazes. O mTOR participa na expressão de uma variedade de genes em resposta a estímulos celulares e pode desempenhar um papel-chave na manifestação da doença. Nossos dados demonstram a diminuição da expressão desse marcador em pacientes hospitalizados com maior gravidade, porém estudos são necessários para reforçar esta tendência.

**Keywords:** mTOR, mTORC1, mTORC2, proteína de sinalização, bronquiolite aguda

## ABSTRACT

**Introduction:** infection of the lower respiratory tract is the most prevalent disease in children during the first years of life. During the viral infection, the inflammatory process is directly associated with immune imbalance. Studies show that the mTOR signaling protein plays an important role in the context of acute bronchiolitis (AB). Thus, it becomes fundamental to recognize the relevance of the immune system and mTOR in fighting infection. The aim of this study was to investigate the relationship between mTOR expression and the severity of acute bronchiolitis in infants.

**Methods:** a cohort study was conducted from a group of infants hospitalized at a tertiary hospital with AB in Porto Alegre, Brazil, aged less than 12 months. The hospitalization protocol included respiratory isolation and collection of nasopharyngeal secretion from all patients with AB. Nasopharyngeal lavage was used for subsequent extraction of RNA and cDNA synthesis used for the study of mTOR signaling protein expression. The severity markers used were: time of hospitalization and mean time of wheezing, measured in days. The research was done after consent, obtained from the legal guardian of the child.

**Results:** 56 patients with AB were included. For the final analysis of the study and expression of the mTOR signaling protein, 23 patients participated in the study. The mean age of patients with AB was 3.5 months. The gender distribution was 56.5% for males. The markers of severity were related to the expression of the mTOR signaling protein. The mTOR signaling protein was measured and analyzed on each of the variables respectively. Data were stratified according to severity markers and showed a trend towards decreased mTOR expression in patients with a wheezing time of 5 days or more (r -0.702 and p 0.024).

**Conclusion:** transcription factors are essential for generating effective immune responses. mTOR participates in the expression of a variety of genes in response to cellular stimuli and may play a key role in the manifestation of the disease. Our data demonstrate the decrease in expression of this marker in hospitalized patients of greater severity, but studies are needed to reinforce this trend.

**Keywords:** mTOR, mTORC1, mTORC2, signaling protein, acute bronchiolitis



## INTRODUÇÃO

A infecção do trato respiratório inferior tem grande impacto em crianças durante os primeiros anos de vida (1,2). A bronquiolite aguda (BA) pode levar a complicações graves, insuficiência respiratória e está associada à elevada morbidade e mortalidade (3–5). A BA é causada pelo vírus sincicial respiratório (VSR) e outros agentes etiológicos: parainfluenza, rinovírus, metapneumovírus, influenza e adenovírus, dentre outros. Algumas patologias estão fortemente associadas à bronquiolite grave como a doença cardíaca congênita, displasia broncopulmonar e distúrbios imunológicos (1,3,6,7). O risco de BA grave e complicações relacionadas é bem reconhecido entre esses grupos (8).

As infecções por vírus respiratórios ocorrem em todo o mundo, com surtos em climas temperados ocorrendo principalmente durante os meses de inverno (9). Estudos documentaram as variações nas taxas de hospitalização, tempo de permanência hospitalar, morbidade e mortalidade em diferentes países, dependendo da localização geográfica (5,10–13). Os dados demonstram ainda, o papel importante do VSR na causa da hospitalização em crianças prematuras como um determinante crítico de gravidade da doença (4).

A infecção provoca uma inflamação do epitélio bronquiolar, podendo ocorrer necrose das células epiteliais, edema da mucosa, infiltração peribronquial e produção de secreção (14,15). A obstrução dos bronquíolos causa diminuição parcial ou total do fluxo de ar. O grau de obstrução pode variar, resultando em sinais clínicos como atelectasia, diminuição da ventilação pulmonar e perfusão, podendo levar à hipoxemia (16). A resposta imune ao vírus é caracterizada pela inflamação significativa e pode contribuir para a patogênese da doença. O recrutamento de neutrófilos para vias aéreas pode mediar diretamente a destruição de células infectadas. A infecção grave em lactentes é mediada por uma regulação insuficiente da resposta imune do hospedeiro de células T reguladoras (Tregs), resultando em imunopatologia (16,17). Durante a infecção viral, o processo inflamatório está diretamente associado ao desequilíbrio imunológico promovendo assim, um aumento na resposta Th2 (18,17).

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos, *mammalian target of rapamycin* (mTOR) é uma via de sinalização conservada evolutivamente que detecta nutrientes intra e extracelulares, fatores de crescimento e padrões moleculares associados aos patógenos para regular a função das populações de células imunes inatas e adaptativas (19–21). O mTOR desempenha sua função na regulação de vários processos biológicos, tais como a proliferação e sobrevivência de células normais e malignas, diferenciação celular, metabolismo, e autofagia (22–24). Recentemente, Souza *et al*, destacou que o mTOR desempenha um papel importante no contexto da bronquiolite aguda. Este estudo sugere que a ativação de mTOR induzida por VSR durante a infecção está associada com um mecanismo de evasão imune viral a partir de respostas das células T CD8 e poderia ser um alvo promissor para futuras intervenções (6).

A resposta imune humana frente à infecção viral pode ser um fator relevante na determinação da gravidade da BA. Assim, torna-se fundamental, reconhecer a relevância do sistema imune no combate à infecção. O objetivo do presente estudo foi investigar a associação entre a expressão da proteína de sinalização mTOR e a gravidade da bronquiolite (tempo de sibilância e tempo de internação).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostra e delineamento do estudo**

Este estudo é uma análise secundária e retrospectiva de uma coorte de lactentes com bronquiolite aguda. Foi incluído um grupo de lactentes em um hospital terciário com BA em Porto Alegre, Brasil, com idade inferior a 12 meses. Os critérios de inclusão utilizados: pacientes internados em enfermaria ou sala de observação, pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no Hospital São Lucas da PUCRS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) com entrada na emergência pediátrica, de setembro de 2009 a setembro de 2011; pacientes com suspeita clínica de BA (primeiro episódio de sibilância, acompanhado de infecções de vias aéreas superiores); lactentes menores de 12 meses de idade e pacientes com um máximo de 72 horas de manifestações clínicas do trato

respiratório inferior (sibilância e/ou dificuldade respiratória), a fim de evitar a inclusão de lactentes no período de convalescença.

Os critérios de exclusão adotados foram: histórico de doenças pulmonares relacionadas à prematuridade (displasia bronco-pulmonar); cardiopatias; doenças pulmonares crônicas e uso de corticoides (sistêmicos ou inalatórios).

### Procedimentos

Após a inclusão do paciente no estudo, foram coletados os dados referentes às condições clínicas do paciente, obtidos no momento da admissão hospitalar: sinais vitais e parâmetro ventilatório (sinais de dificuldade respiratória). Estas informações foram extraídas dos prontuários. A história clínica foi coletada através dos pais ou responsável por meio de um questionário padronizado. As informações sobre o curso clínico da doença até a alta, como duração da internação hospitalar e tempo de sibilância foram coletadas pelos médicos e pesquisadores do estudo assim como as variáveis demográficas. A variável sibilância foi avaliada a partir da ausculta diária realizada pelos pesquisadores durante o estudo.

Os pacientes incluídos no estudo foram contatados (contato telefônico) aos 30, 60 e 90 dias para avaliação da recorrência de sibilância, através da aplicação de questionário padronizado.

### Coleta e armazenamento de amostras

O protocolo de internação incluiu isolamento respiratório e coleta de secreção nasofaríngea de todos os pacientes com BA. A coleta de amostras e a imunofluorescência direta (ID) são rotina na avaliação de crianças com bronquiolite neste hospital. O lavado nasofaríngeo foi armazenado em solução de Trizol à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB-PUC) para posterior extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). O cDNA foi utilizado para identificação de vírus respiratórios pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (25), e para a dosagem de expressão da proteína mTOR.

## Análise por PCR

A extração de RNA total foi realizada pelo método de TRIzol (*Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit Superscript III (*Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*). As amostras foram incubadas a 65°C por 5 min, utilizando o termociclador, PTC-100™, (*MJ Research, Canada, EUA*). Após esse procedimento 10µl de *first-strand reaction mix* foram acrescentados e 2µl de SuperScript III/RNase out enzyme mix. As amostras foram incubadas novamente por 25°C durante 10 min, 50°C por 50 min, e 85°C por 5 min. Posteriormente, foram realizadas a quantificação das amostras de cDNA com o Kit *Deoxyribonucleic acid high sensitivity* (DNAhs) Qubit (*Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*). A qualidade do cDNA para cada amostra foi testada por amplificação do gene constitutivo β-actina, utilizando sistema de PCR em Tempo Real StepOne™, *TaqMan Universal PCR Master Mix*-catálogo 4304437 e iniciadores específicos (*Applied Biosystems-AB, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*). As amostras que não amplificaram para β-actina foram excluídas do estudo. As amostras foram armazenadas em temperatura de -20° C.

A amostra foi utilizada para identificação da etiologia da doença. Foram realizadas reações de PCR em tempo real quantitativo para amplificar genes específicos do VSR utilizando 4 ng de cDNA em triplicata para cada paciente (25).

## Expressão da proteína de sinalização mTOR

O DNA extraído foi utilizado para o estudo da expressão da proteína de sinalização mTOR. O controle constitutivo utilizado como normalizador foi a β-actina (ACTB) Hs01060665\_g1 e o gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH), Hs 03929097\_g1 e para a expressão de mTOR, Hs 00234508\_m1. A expressão relativa foi realizada usando iniciadores específicos e sondas *TaqMan* (*Applied Biosystems-AB, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*) para o ensaio. A quantificação da expressão de genes foi realizada utilizando *StepOne™* para PCR em tempo real (*Applied Biosystems-AB, ThermoFisher Scientific, MA, EUA*). A expressão de RNA foi determinada através do método do ciclo delta limiar (Δ-CT). O valor de delta foi calculado subtraindo-se o valor

de *Threshold cycle* (CT) de  $\beta$ -actina e GAPDH a partir do valor de CT para mTOR de cada uma das amostras.

### Análise estatística

A gravidade da doença foi avaliada pelo tempo de internação e tempo médio de sibilância. A análise estatística inclui a amostra do estudo, constituída pelo grupo de crianças com bronquiolite. Conforme a distribuição das variáveis, a análise foi descritiva utilizando testes de proporções, descrições em média (desvio padrão- DP) e mediana (intervalo interquartil- IC). Associações entre variáveis categóricas e desfechos contínuos (comparação dos marcadores de gravidade clínica) foram analisadas pelo teste t de *Student* seguido por um pós-teste de Bonferroni. As principais variáveis do estudo foram avaliadas através do teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados categóricos foram apresentados em frequência absoluta e relativa. O coeficiente de correlação de *Spearman* foi utilizado para correlacionar os dados não-paramétricos. Utilizou-se teste de regressão linear simples e regressão logarítmica para testar a influência da ocorrência do VSR+ sobre o desfecho sibilância. As análises foram realizadas com os programas *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 17.0) e o software *GraphPad Prism* (San Diego, CA, EUA). Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0.05$ .

Foi ainda realizada análise estratificada por gravidade (acima de 5 dias de internação e < de 5 dias de internação) e por vírus (VSR positivo ou negativo).

### Ética

A pesquisa foi realizada após consentimento, obtido junto ao responsável legal da criança, sujeito da pesquisa, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A autorização da participação do paciente ocorreu antes de qualquer procedimento. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, porém a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. As amostras do lavado broncoalveolar e DNA foram armazenadas apenas com seu registro, sem o nome ou iniciais. Somente os pesquisadores poderão identificar a origem das amostras. O Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS poderá ter acesso aos dados da pesquisa para assegurar

que seus direitos estão sendo protegidos. A pesquisa foi iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS.

## RESULTADOS

No presente estudo foram incluídos 104 pacientes com BA. Para a análise final do estudo e expressão da proteína de sinalização mTOR, 23 pacientes continham quantificação mínima necessária de cDNA ( Figura 1). A média de idade dos pacientes com BA foi de 3,5 meses. A distribuição na variável sexo foi de 56,5% para o sexo masculino. Os dados clínicos referentes à admissão do paciente mostram média de  $49,69 \pm 14,27$  para frequência respiratória e média de saturação de  $O_2$  ( $SPO_2$ ) de 91% em ar ambiente, segundo dados extraídos do prontuário do paciente na chegada deste na unidade de saúde. Os resultados apontam que 95,65% (22 lactentes) apresentaram algum tipo de retração e 2 pacientes evoluíram para ventilação mecânica (1,6%). Os marcadores clínicos de gravidade utilizados foram: tempo de internação e tempo de sibilância, medidos em dias. O tempo de permanência hospitalar foi de 6,27 dias ( $\pm 2,58$ ) e o tempo médio de sibilância foi de 4,04 dias ( $\pm 2,58$ ). A amostra foi utilizada para identificação de vírus respiratórios, dentre eles o vírus sincicial respiratório (VSR). Os dados mostram uma prevalência de 56,5% dos pacientes para o VSR+ (Tabela 1).

A proteína de sinalização mTOR foi medida e correlacionada em cada uma das variáveis. Foi realizada análise estratificada por gravidade (acima de 5 dias de internação e < de 5 dias de internação). Os dados foram subdivididos de acordo com os marcadores de severidade e mostraram uma diminuição da expressão de mTOR em pacientes com tempo de sibilância igual ou superior a 5 dias ( $r -0,702$  e  $p 0,024$ ). Ao utilizar a correlação de Spearman para relacionar a expressão do mTOR e o tempo de internação, obtivemos  $r -0,045$  e  $p ,901$ , valores não significativos (Tabela 2).

No teste de regressão logarítmica, foi observada uma relação inversa entre a expressão de mTOR e o tempo de sibilância entre os pacientes mais graves (>5 dias de internação). Além disso, essa relação parece ser mais intensa nos pacientes com VSR+. Os pacientes incluídos no estudo foram contatados (contato telefônico) aos 30, 60 e 90

dias para avaliação da ocorrência de sibilância. Os dados foram analisados através da regressão linear e mostram uma tendência à sibilância recorrente no grupo VSR+ ( $p=0,06$ ) (Figura 2 e 3).

## DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo demonstram uma tendência à diminuição da expressão de mTOR em pacientes com maior tempo de sibilância. Ao reconhecer os mecanismos de controle da inflamação, observamos que a replicação viral, principalmente do VSR em lactentes, pode estar regulada pela expressão de alguns genes, neste caso especificamente pela proteína de sinalização mTOR. Existe evidência clara de que as crianças que desenvolvem sintomas respiratórios inferiores durante a infecção pelo VSR no início da vida estão em maior risco de desenvolver sibilância pós-infecção viral (26–29).

O estudo investigou a influência da proteína de sinalização mTOR e a gravidade da bronquiolite aguda em lactentes. Estudos revelam resultados encontrados em células e mediadores detectados no líquido de lavagem broncoalveolar (BAL), tipicamente de crianças ventiladas mecanicamente, e também, lavados nasofaríngeos, em associação com infecção aguda por VSR. Neutrófilos, citocinas pró-inflamatórias, TNF $\alpha$  e as quimiocinas estão entre as células detectadas com maior frequência nas vias aéreas e secreções nasais de crianças infectadas (30). Muitas citocinas parecem desempenhar um papel nesta resposta imune aguda, incluindo o IFN  $\gamma$ ; Interleucinas 8, 10 e 12 e ainda citocinas produzidas por células T helper (Th 1 e Th2). Entretanto, foram relatados níveis variáveis de citocinas Th1 (IFN  $\gamma$ ) e Th2 (IL-4, IL-5), sendo a resposta Th2, tipicamente elevada nos pacientes infectados predominantemente pelo VSR. A resposta específica de Th2 nos lactentes está associada a uma predileção para desenvolver a sibilância infantil (29,31). A síntese de proteínas é um dos processos que consomem mais energia na célula. O mTOR integra uma multiplicidade de sinais intracelulares e extracelulares para impulsionar o crescimento celular. Este desempenha um papel crítico na coordenação da reprogramação imunológica e metabólica para promover a diferenciação efetiva das células T em resposta ao antígeno (32). A atividade mTOR é central para a homeostase energética coordenando a síntese proteica, gerando intermediários metabólicos e

biogênese mitocondrial (33). Souza *et al*, 2016, apresentaram a hipótese de que a ativação de mTOR é um mecanismo de virulência onde ocorre a diminuição da atividade de células T CD8, especialmente no compartimento de memória. Entretanto, investigou se a infecção por VSR modula a atividade de mTOR no processo de diferenciação das células T CD8. Os dados demonstram que o vírus induz a fosforilação de mTOR e a expressão do gene mTOR aumenta significativamente, em secreções nasais de pacientes infectados com VSR, em comparação com lactentes não infectados, indicando o papel de mTOR durante a replicação do VSR (6). Alguns estudos têm demonstrado que o uso da rapamicina diminuiu mTOR aumentando a replicação de VSR (6,34,35).

Krawiec e colegas realizaram broncoscopia e lavagem broncoalveolar (BAL) em crianças, idade média de 15 meses, com sibilância recorrente, além de um grupo de controles saudáveis. Este estudo demonstrou que as crianças com sibilância persistente tinham células inflamatórias aumentadas e marcadores de inflamação em comparação com controles saudáveis. Essa associação não é ainda bem compreendida, porém o aumento da probabilidade de sensibilização alérgica desempenha um papel determinante da sibilância pós- VSR (36). As evidências atuais sugerem que fatores tanto genéticos como ambientais determinam o tipo de resposta imune à infecção por VRS aguda e que essa resposta, por sua vez, pode afetar o desenvolvimento dos mecanismos de controle envolvidos na regulação do tom da via aérea. Como a asma é uma condição heterogênea, os estudos futuros precisarão determinar o papel potencialmente diferente da infecção por VSR como fator de risco para esses diferentes fenótipos de asma. É provável, no entanto, que as estratégias para a prevenção da infecção por VSR possam desempenhar um papel na prevenção do desenvolvimento subsequente de sintomas de sibilância persistente e de asma na infância (30). No entanto, alguns estudos podem esclarecer os processos inflamatórios que ocorrem nessas crianças.

A análise da relação entre a expressão da proteína e a gravidade da bronquiólite demonstra o papel do mecanismo inflamatório frente à infecção, porém há limitações nas evidências que apoiam esta declaração. Podemos considerar que, a principal limitação do presente estudo refere-se ao número de participantes da pesquisa, devido às quantidades insuficientes de amostras de cDNA para a realização das reações de PCR em tempo real. Além disso, pode-se ressaltar a limitação do número de dados sobre a coinfeção.



Entretanto, Scotta *et al* revelou em estudo recente que, a coinfeção viral respiratória não aumentou a severidade nos resultados avaliados: tempo de permanência, tempo de uso de oxigênio suplementar, necessidade de cuidados intensivos, ventilação mecânica e morte. Deste modo, as subanálises de acordo com a idade e as combinações virais também não mostraram influência desses fatores nos resultados (37). Outra limitação é a de que a manifestação da bronquiolite aguda pode variar significativamente. A gravidade da doença evidencia diferentes fatores genéticos, imunológicos e clínicos envolvidos na resposta de cada indivíduo frente à infecção assim, a falta de entendimento sobre os mecanismos responsáveis pela doença, altamente prevalente na população pediátrica em todos os continentes, tem determinado uma incessante busca de respostas (3,4).

É importante reconhecer que não há consenso sobre a importância relativa de qualquer citocina ou quimiocina específicas em relação à gravidade ou melhoria da doença. No entanto, as vias individuais foram direcionadas em várias experiências de modelos preliminares. A bronquiolite é uma área ativa de pesquisa, muitos estudos determinantes têm contribuído para o conhecimento desta patologia nos últimos anos (3). Nossos dados sugerem que pacientes que sibilaram mais, conseqüentemente durante as manifestações mais severas, apresentaram menor expressão da proteína mTOR. Acreditamos que, possivelmente, o mTOR diminuído possa estar contribuindo com maior replicação viral, determinando assim, maior comprometimento do paciente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díez-Domingo J, Pérez-Yarza EG, Melero JA, Sánchez-Luna M, Aguilar MD, Blasco AJ, et al. Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. *BMC Infect Dis.* 2014 Dec 30;14(1):544.
2. Flaherman VJ, Ragins AI, Li SX, Kipnis P, Masaquel A, Escobar GJ. Frequency, duration and predictors of bronchiolitis episodes of care among infants  $\geq 32$  weeks gestation in a large integrated healthcare system: a retrospective cohort study Valerie. *BMC Health Serv Res.* 2012 Dec 8;12(1):144.
3. Wainwright C. Acute viral bronchiolitis in children- a very common condition with few therapeutic options. *Paediatr Respir Rev.* 2010 Mar;11(1):39–45.
4. Stein RT, Bont LJ, Zar H, Polack FP, Park C, Claxton A, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol.* 2017 Apr;52(4):556–69.

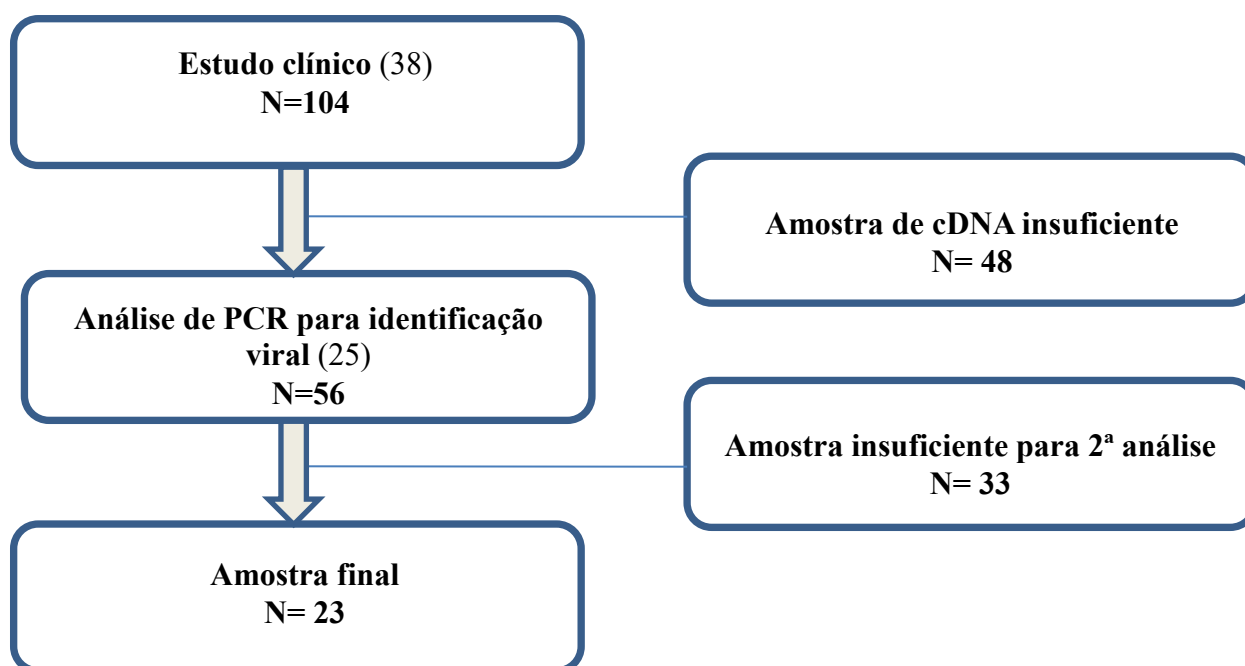
5. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 May;375(9725):1545–55.
6. de Souza APD, de Freitas DN, Antunes Fernandes KE, D'Avila da Cunha M, Antunes Fernandes JL, Benetti Gassen R, et al. Respiratory syncytial virus induces phosphorylation of mTOR at ser2448 in CD8 T cells from nasal washes of infected infants. *Clin Exp Immunol*. 2016 Feb;183(2):248–57.
7. Rudraraju R, Jones B, Sealy R, Surman S, Hurwitz J. Respiratory Syncytial Virus: Current Progress in Vaccine Development. *Viruses*. 2013 Feb;5(2):577–94.
8. Shi T, Balsells E, Wastnedge E, Singleton R, Rasmussen ZA, Zar HJ, et al. Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015;5(2).
9. Russell CD, Unger stefan a, Walton M, Schwarze J. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Apr;30(2):481–502.
10. Arruda E, Jones MH, Escremim de Paula F, Chong D, Bugarin G, Notario G, et al. The Burden of Single Virus and Viral Coinfections on Severe Lower Respiratory Tract Infections Among Preterm Infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Oct;33(10):997–1003.
11. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005 Mar;365(9465):1147–52.
12. Broor S, Dawood FS, Pandey BG, Saha S, Gupta V, Krishnan A, et al. Rates of respiratory virus-associated hospitalization in children aged <5 years in rural northern India. *J Infect*. 2014;68(3):281–9.
13. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. *N Engl J Med*. 2009 Feb 5;360(6):588–98.
14. Brearey S.P. SRL. Pathogenesis of RSV in children. In: Respiratory syncytial virus. Elsevier. 2007. p. 141–162.
15. Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Patologia estrutural e funcional 6<sup>a</sup> edição. Guanabara. Rio de Janeiro; 2000. p. 45–78.
16. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: Recent Evidence on Diagnosis and Management. *Pediatrics*. 2010 Feb 1;125(2):342–9.
17. Christiaansen AF, Syed M a, Ten Eyck PP, Hartwig SM, Durairaj L, Kamath SS, et al. Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants. *Pediatr Res*. 2016 Nov 21;80(5):702–9.
18. Gut W, Pancer K, Abramczuk E, Cześćik A, Dunal-Szczepaniak M, Lipka B, et al.

- RSV respiratory infection in children under 5 y.o.--dynamics of the immune response Th1/Th2 and IgE. *Przegl Epidemiol.* 2013;67(1):17–22, 105–9.
19. Mills RE, Jameson JM. T cell dependence on mTOR signaling. *Cell Cycle.* 2009;8(4):545–8.
  20. Yecies JL, Manning BD. Transcriptional Control of Cellular Metabolism by mTOR Signaling. *Cancer Res.* 2011 Apr 15;71(8):2815–20.
  21. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Mol Cell.* 2010 Oct;40(2):310–22.
  22. Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine.* 2013 Apr;31(SUPPL2):B209–15.
  23. Saleiro D, Platanias LC. Intersection of mTOR and STAT signaling in immunity. *Trends Immunol.* 2015 Jan;36(1):21–9.
  24. Von Linstow M-L, Høgh M, Nordbo SA, Eugen-Olsen J, Koch A, Høgh B. A community study of clinical traits and risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus infection during the first year of life. *Eur J Pediatr.* 2008 Oct 3;167(10):1125–33.
  25. Souza APD de, Leitao LA de A, Luisi F, Souza RG, Coutinho SE, Silva JR da, et al. Lack of association between viral load and severity of acute bronchiolitis in infants. *J Bras Pneumol.* 2016 Aug;42(4):261–5.
  26. Webley WC, Hahn DL. Infection-mediated asthma : etiology , mechanisms and treatment options , with focus on Chlamydia pneumoniae and macrolides. *Respir Res.* 2017;18(1):98.
  27. Hansbro NG, Horvat JC, Wark PA, Hansbro PM. Understanding the mechanisms of viral induced asthma : New therapeutic directions. *Pharmacol Ther.* 2008;117:313–53.
  28. Lu S, Hartert T V, Everard ML, Giezek H, Nelsen L, Mehta A, et al. Predictors of Asthma Following Severe Respiratory Syncytial Virus (RSV) Bronchiolitis in Early Childhood. *Pediatr Pulmonol.* 2016;51:1382–92.
  29. Martinez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:76–82.
  30. Noah TL, Ivins SS, Murphy P, Kazachkova I, Moats-staats B, Henderson FW. Chemokines and Inflammation in the Nasal Passages of Infants with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Clin Immunol.* 2002;104(1):86–95.
  31. Jackson, Daniel J. The role of respiratory virus infections in childhood asthma inception. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010;30(4):513–22.
  32. Pollizzi KN, Powell JD. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and

- the known unknowns. *Trends Immunol.* 2015 Jan;36(1):13–20.
33. Morita M, Gravel S-P, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, et al. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle.* 2015 Feb 16;14(4):473–80.
  34. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature.* 2009 Jul 2;460(7251):108–12.
  35. do Nascimento de Freitas D, Gassen RB, Fazolo T, Souza APD de. Rapamycin increases RSV RNA levels and survival of RSV-infected dendritic cell depending on T cell contact. *Toxicol Vitr.* 2016 Oct;36:114–9.
  36. Krawiec ME, Westcott JAYY, Chu HWEI, Balzar S, Trudeau JB, Schwartz LB, et al. Persistent Wheezing in Very Young Children Is Associated with Lower Respiratory Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1338–43.
  37. Comerlato M, Coutinho V, Gava B, Moura A De, Garces R, Paula A, et al. Respiratory viral coinfection and disease severity in children : A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.* 2016;80:45–56.
  38. Pinto LA, Pitrez PM, Luisi F, de Mello PP, Gerhardt M, Ferlini R, Barbosa DC, Daros I, Jones MH, Stein RT MP. Azithromycin Therapy in Hospitalized Infants with Acute Bronchiolitis is Not Associated with Better Clinical Outcomes: A Randomized, Double-Blinded, and Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Pediatr.* 2012;161(6):1104–8.

**Figura 1.** Diagrama de fluxo representando a amostra utilizada para análise da expressão da proteína de sinalização mTOR.

## Diagrama de fluxo



(38) Pinto *et al*, *Azithromycin therapy in hospitalized infants with acute bronchiolitis is not associated with better clinical outcomes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial*. J Pediatr. 2012

(25) Souza *et al*. *Lack of association between viral load and severity of acute bronchiolitis in infants*. J Bras Pneumol. 2016 Aug;42(4):261–5.

**Tabela 1.** Grupo de estudo, dados descritivos da amostra.

	<b>BA* (N =23)</b>
Idade em meses (média)	3.58 ±2,58
Gênero (% masculino)	56,52%
Tempo de permanência hospitalar (dias)	6,27 ± 2,58
Frequência respiratória (mpm)	49,69 ±14,27
SPO <sub>2</sub> na admissão (%)	91%
Retrações, N (%)	22 (95,65%)
Ventilação mecânica, N (%)	2 (1,6%)
VSR+	13 (56,5%)

BA\*= Bronquiolite aguda com internação hospitalar

VSR+= Vírus sincicial respiratório positivo

SPO<sub>2</sub>= Saturação de oxigênio

**Tabela 2.** Coeficiente de correlação entre pacientes com tempo de sibilância maior ou igual a 5 dias.

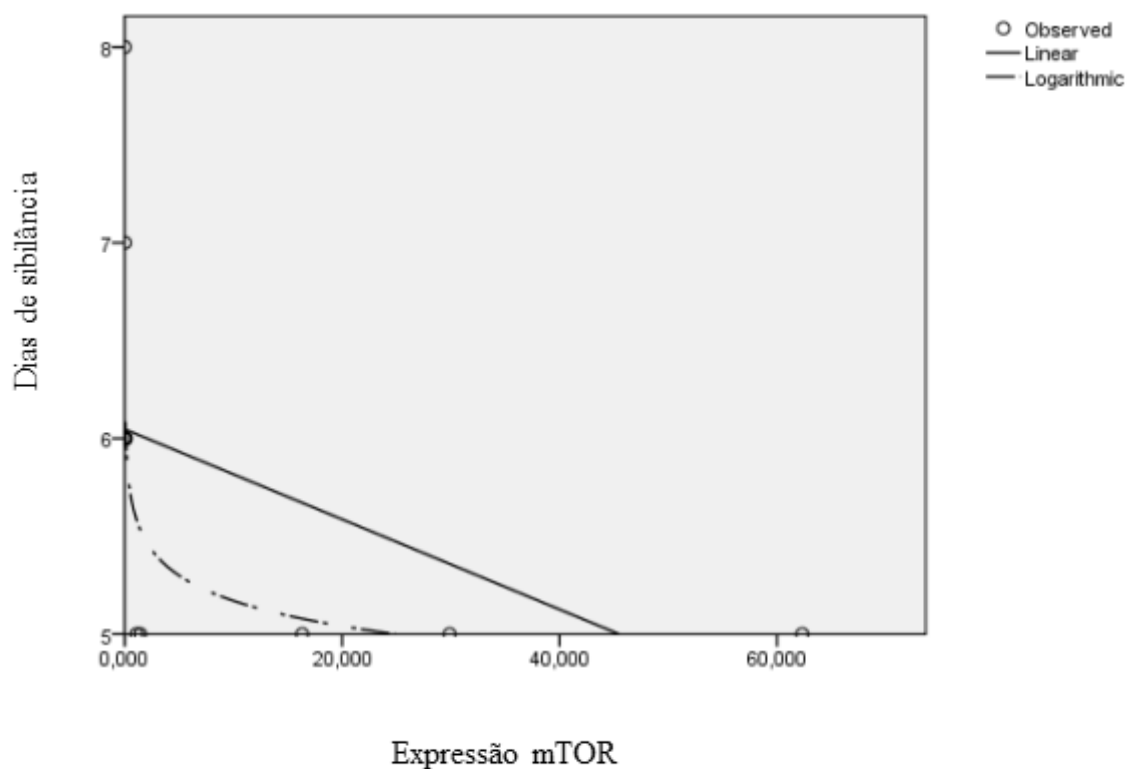
			<b>mTOR</b>	<b>DIAS INT</b>	<b>DIAS SIB</b>
<b>Spearman's rho</b>	mTOR	Corr Coefficient	1,000	-,045	-,702*
		Sig. (2-tailed)	.	,901	,024

\*. A correlação é significativa ao nível de 0,05 (2-tailed).

\*\*. A correlação é significativa ao nível de 0,01 (2-tailed).

6a. CATSIB5 = Maior / Igual 5

**Figura 2.** Modelo de regressão linear simples e regressão logarítmica  $p=0,016$

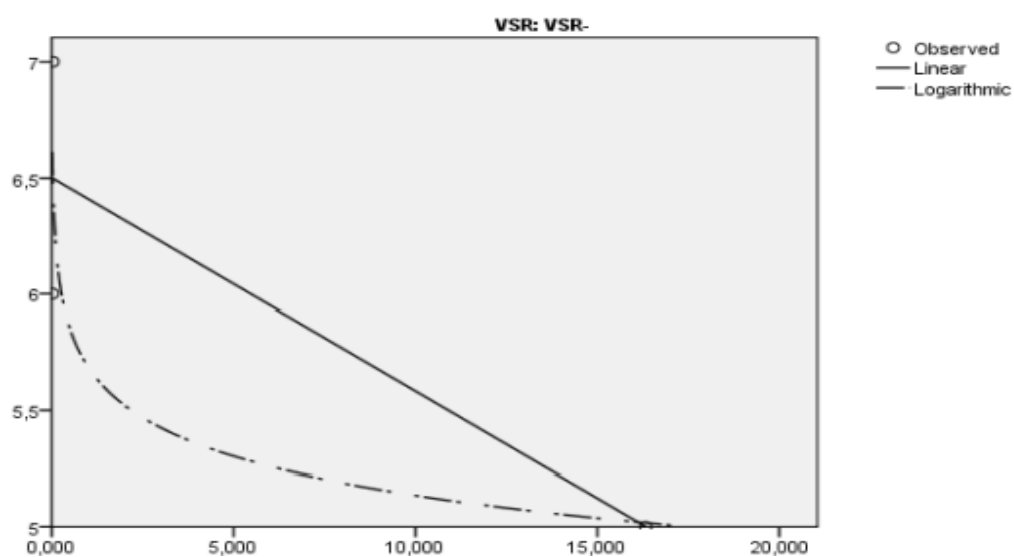
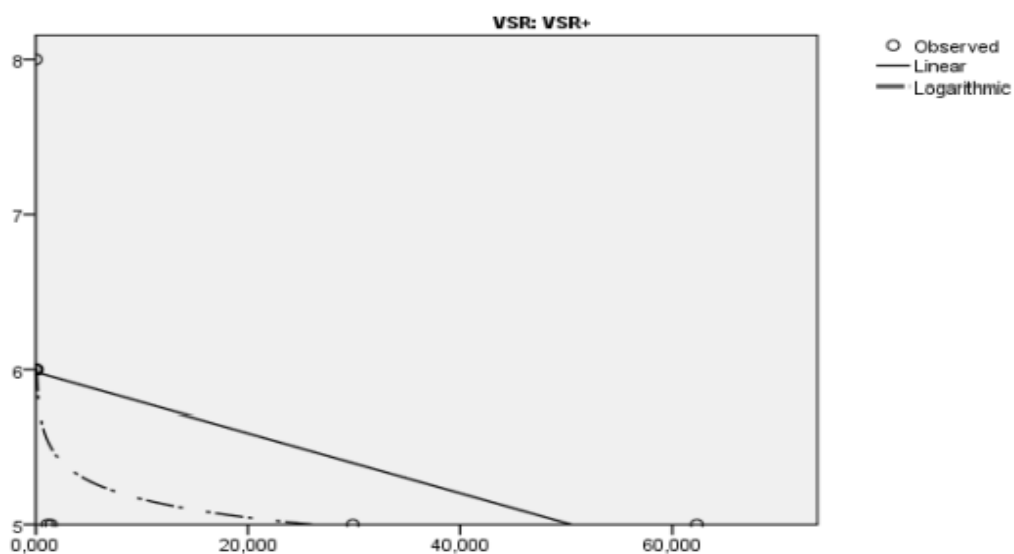


Equação	Modelo					Parâmetro/Estimativa	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constante	b1
Linear	,220	2,823	1	10	,124	6,047	-,023
Logarítmico	,457	8,418	1	10	,016*	5,600	-,187

\*. A correlação é significativa ao nível de 0,05 (2-tailed).

\*\*.. A correlação é significativa ao nível de 0,01 (2-tailed).



**Figura 3.** Análise estratificada Grupo de pacientes VSR+ p=0,066

VSR	Equação	Modelo					Parâmetro/Estimativa	
		R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
VSR+	Linear	,190	1,638	1	7	,241	5,983	-,019
	Logarítmico	,403	4,730	1	7	,066*	5,564	-,173
VSR-	Linear	,750	2,995	1	1	,334	6,503	-,092
	Logarítmico	,725	2,642	1	1	,351	5,688	-,240

VSR+ vírus sincicial respiratório

\*. A correlação é significativa ao nível de 0,05 (2-tailed).

## APÊNDICE 2 - PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO

J Bras Pneumol. 2016;42(4):261-265  
<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37562015000000241>

ORIGINAL ARTICLE



## Lack of association between viral load and severity of acute bronchiolitis in infants

Ana Paula Duarte de Souza<sup>1</sup>, Lidiane Alves de Azeredo Leitão<sup>2</sup>,  
 Fernanda Luisi<sup>2</sup>, Rodrigo Godinho Souza<sup>2</sup>, Sandra Eugênia Coutinho<sup>2</sup>,  
 Jaqueline Ramos da Silva<sup>2</sup>, Rita Mattiello<sup>2</sup>, Paulo Márcio Condessa Pitrez<sup>2</sup>,  
 Renato Tetelbom Stein<sup>2</sup>, Leonardo Araújo Pinto<sup>2</sup>

1. Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Centro Infantil, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.
2. Laboratório de Respirologia Pediátrica, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Infant Center, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.

Submitted: 22 September 2015.  
 Accepted: 25 February 2016.

Study carried out at the Centro Infantil, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the correlation between respiratory syncytial viral load and length of hospitalization in infants with acute wheezing episodes. **Methods:** This was a two-year, cross-sectional study of infants  $\leq$  12 months of age with bronchiolitis at the time of admission to a tertiary hospital. For the identification of respiratory viruses, nasopharyngeal secretions were collected. Samples were analyzed (throughout the study period) by direct immunofluorescence and (in the second year of the study) by quantitative real-time PCR. **We screened for three human viruses:** rhinovirus, respiratory syncytial virus, and metapneumovirus. **Results:** Of 110 samples evaluated by direct immunofluorescence, 56 (50.9%) were positive for a single virus, and 16 (14.5%) were positive for two or more viruses. Among those 72 samples, the most prevalent virus was respiratory syncytial virus, followed by influenza. Of 56 samples evaluated by quantitative real-time PCR, 24 (42.8%) were positive for a single virus, and 1 (1.7%) was positive for two viruses. Among those 25 samples, the most prevalent virus was again respiratory syncytial virus, followed by human rhinovirus. Coinfection did not influence the length of the hospital stay or other outcomes. In addition, there was no association between respiratory syncytial virus load and the length of hospitalization. **Conclusions:** Neither coinfection nor respiratory syncytial viral load appears to influence the outcomes of acute bronchiolitis in infants.

**Keywords:** Bronchiolitis; Coinfection; Viral load; Hospitalization; Respiratory syncytial virus, human.

## PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO

Pediatric Pulmonology 41:S7–S64 (2016)

## XI SOLANEP International Congress / XV Cystic Fibrosis Latinamerican Congress / XV Brazilian Congress of Pediatric Pulmonology

062

### INTERLEUKIN-8 GENE VARIATIONS AND THE SUSCEPTIBILITY TO SEVERE BRONCHIOLITIS

*Lidiane Alves de Azeredo Leitão; Magáli Mocellin; Ana Paula Duarte de Souza; Leonardo Araújo Pinto.*

*Centro Infant, Instituto de Pesquisas Biomédicas, FAMED, PUCRS*

Objective: almost all infants present infection by respiratory syncytial virus (RSV) up to 2 years of age. However, the severity of acute bronchiolitis (AB) can vary significantly. This variability may be caused by genetic and/or immunological factors. Previous studies have shown that RSV-infected airway contain high levels of interleukin 8 (IL-8). The knowledge of genetic polymorphisms associated with severe AB may have clinical relevance, identifying patients with high-risk for severe bronchiolitis. The aim of the present study was to compare the frequency of IL-8 polymorphisms in infants with severe AB and controls recruited in a low-income area in Southern Brazil. Material and methods: we included infants admitted to the pediatric emergency of Hospital Sao Lucas (HSL) da PUCRS with AB, aged less than 12 months, in the period between 2009 to 2011. Infants of the same age who did not have had AB, were recruited from the primary care center Bom Jesus (controls). Capillary blood samples were collected and DNA was extracted for genotyping of single nucleotide polymorphism using FTA Classic Card (Whatman, Florham Park, USA). Genotyping of two polymorphisms (SNPs rs2227543 and rs2227307) in the IL-8 gene was performed using TAQMAN (Applied Biosystems – AB, Carlsbad, California). Results: in the final genetic association study, we included 115 cases and 64 controls. There was no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The SNP rs2227543 showed significant protection for AB, with higher frequency of homozygous TT patients in the control group (OR 0.25; CI 0.10 to 0.65). However, rs2227307 showed no association with AB. Conclusion: this finding, together with the analysis of previous studies, suggests that the IL-8 polymorphism rs2227543 is associated with protection of AB and influences the severity of the disease.

after hospital discharge and need to be followed. Household smoking, atopic dermatitis, FHA, low gestational and birth weight, cardiopathy, low maternal schooling, large families, age at admission, severity of BVA and type of virus were associated with maintenance of symptoms.

064

### EVALUATION OF THE VENTILATORY EFFICIENCY INDEX (VE/VCO<sub>2</sub>) AS A PROGNOSIS MARKER IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

*Paloma Lopes Francisco Parazzi (Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas); Fernando Augusto de Lima Marson (Department of Pediatrics and Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas); Maria Ângela Gonçalves de Oliveira Ribeiro (Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas); Camila Isabel Santos Schivinski (State University of Santa Catarina, Center of Physical Education and Sports); Antônio Fernando Ribeiro (Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas); José Dirceu Ribeiro (Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas).*

Objectives: Physical exercise have been studied as a tool to assess the worsening or the improvement of clinical markers of cardiorespiratory function. Clinical markers of lung function deterioration in cystic fibrosis (CF) have been studied and the relation between ventilation (VE) and the production of carbon dioxide (VE/VCO<sub>2</sub> slope) can be used to determine ventilatory responses to exercise. Our objective was to evaluate if the VE/VCO<sub>2</sub> ratio is a useful marker as a prognostic indicator for children and adolescents with CF. Material: A controlled, clinical trial, with 128 individuals, 64 with CF and 64 in the control group (CG), of both genders, from a University Hospital. Methodology: All individuals completed the submaximal stress test (SST) on the treadmill for 6 min and other exams, after the approval of the Institutional Ethics Committee and signed Informed Consent form. The comparison between the groups of patients with CF and

## PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO

*Epidemiol. Infect.*, Page 1 of 5. © Cambridge University Press 2016  
doi:10.1017/S0950268816002648

---

**SHORT REPORT****IL-8/IL-17 gene variations and the susceptibility to severe viral bronchiolitis**

---

L. A. PINTO<sup>1,2\*</sup>, L. A. DE AZEREDO LEITÃO<sup>1,2</sup>, M. MOCELLIN<sup>1,2</sup>,  
P. ACOSTA<sup>1,3</sup>, M. T. CABALLERO<sup>1,3</sup>, R. LIBSTER<sup>1,3</sup>, J. E. VARGAS<sup>1,2</sup>,  
F. POLACK<sup>1,3</sup>, T. COMARU<sup>1,2</sup>, R. T. STEIN<sup>1,2</sup> AND A. P. DE SOUZA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Aliança INFANT Argentina-Brasil*

<sup>2</sup>*Centro INFANT at Institute of Biomedical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

<sup>3</sup>*Fundación INFANT, Buenos Aires, Argentina*

*Received 13 June 2016; Final revision 21 September 2016; Accepted 14 October 2016*

**SUMMARY**

Clinical manifestations of acute bronchiolitis (AB) vary from minimal disease to severe respiratory failure. The response to respiratory viral infections is possibly influenced by genetic polymorphisms linked to the regulation of the inflammatory response. In the present study, we investigated whether interleukin-8 (IL-8) and interleukin-17 (IL-17) genetic variants are associated with the severity of AB. A group of Brazilian infants hospitalized with AB and a control group (infants with no or mild AB, without hospitalization) were genotyped for four IL-8/IL-17 variations. For replication, we studied an Argentinean population sample of infants with mild and severe AB. IL-8 polymorphism (rs 2227543) and IL-17 (rs2275913) variants showed significant associations with the severity of AB. The effect of the IL-8 variation could be replicated in the Argentinean sample. This finding suggests that IL-8 variations may influence the severity of AB in young infants. Further genetic association studies in low- or middle-income populations are necessary with the aim of expanding knowledge in this area.

**Key words:** Bronchiolitis, interleukin-8, polymorphism, severity, wheezing.