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

LIDIANE ALVES DE AZEREDO LEITÃO

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE *IL-8* E A GRAVIDADE
DA BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA**

PORTO ALEGRE

2013

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL – PUCRS

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE *IL-8* E A GRAVIDADE
DA BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA**

LIDIANE ALVES DE AZEREDO LEITÃO

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Duarte de Souza

Porto Alegre, 2013.

DADOS DE CATALOGAÇÃO

L533r Leitão, Lidiane Alves de Azeredo

Relação entre polimorfismos de *IL-8* e a gravidade da bronquiolite viral aguda / Lidiane Alves de Azeredo Leitão. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

58 f.: il. tab.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto.

Co-orientadora: Ana Paula Duarte de Souza.

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

1. BRONQUIOLITE. 2. POLIMORFISMO. 3. INTERLEUCINA-8. 4. SIBILÂNCIA. 5. CASO-CONTROLE. I. Pinto, Leonardo Araújo. II. Souza, Ana Paula Duarte de. III. Título.

CDD 618.9223

CDU 616.233(043.3)

NLM WS 200

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

DEDICATÓRIA

*Agradeço aos meus pais, Edevaldo e Marta, aos meus irmãos, Leandro, Liliane e Livia,
aos meus sogros, Alfeu e Mariza, pelo apoio em todos os momentos.*

*Ao meu esposo, Luis Otávio, ao meu filho, Bernardo, meu agradecimento pelo amor e
apoio em meus momentos de ausência.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao meu orientador, Dr. Leonardo Araújo Pinto, e à Dra. Daniela Ponzi, pela
oportunidade de realizar esse sonho!*

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, Leonardo Araújo Pinto, minha admiração e agradecimento por sua disponibilidade, dedicação e eficiência em sua orientação.

Agradeço à professora e co-orientadora Ana Paula Duarte de Souza, pela dedicação e empenho durante a realização de importantes etapas deste trabalho.

À professora Bárbara Porto sempre disposta a auxiliar, dividindo seu conhecimento com todos que a procuram.

À amiga Elaine de Oliveira Barbosa, extensão de minha essência pessoal, primeira incentivadora deste projeto.

À minha amiga Cíntia Wsykowski, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Às colegas e companheiras de todas as horas Elenice Carniel e Carina Eidt, obrigada pelo carinho e apoio!

À amiga Magáli Mocellin, que participou da etapa prática desse projeto com muito interesse e dedicação.

Ao técnico Rodrigo Godinho, que incansavelmente repassou seus conhecimentos para que eu pudesse desempenhar um bom trabalho no laboratório.

À Carla Carmo de Melo Rothmann, pela disponibilidade e eficiência em todas as dificuldades encontradas ao longo desses anos.

Às alunas, Gisele Afonso Funchal, Stéfanie Primon Muraro e Patrícia Dias de Araújo, pela ajuda em muitos momentos durante a execução prática desta pesquisa.

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

Muito obrigada!

“O homem é do tamanho de seu sonho!”

Fernando Pessoa

RESUMO

Introdução: Até os 2 anos de idade, praticamente, todos os lactentes apresentam infecção por vírus sincicial respiratório (VSR). Entretanto, a gravidade da bronquiolite viral aguda (BVA) pode variar significativamente. Essa grande variação pode ser causada por fatores genéticos e imunológicos. Estudos prévios indicam que vias aéreas infectadas por VSR contêm níveis elevados de *interleucina-8* (*IL-8*). O conhecimento de polimorfismos genéticos associados à BVA grave pode ter grande relevância clínica, identificando pacientes de alto risco.

Métodos: Foram incluídos lactentes internados na emergência pediátrica do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS com BVA, idade menor de 12 meses, no período entre setembro de 2009 a setembro de 2011, e lactentes da mesma faixa etária que não apresentaram BVA, recrutados junto ao Centro de Saúde Bom Jesus (CSBJ). Foram coletadas amostras de sangue capilar. Desse material, foi extraído DNA utilizado para genotipagem de 2 polimorfismos (SNPs rs2227543 e rs2227307) do gene *IL-8*.

Resultados: Fazem parte da análise final do estudo de associação genética 115 casos e 64 controles. Não foi observado nenhum desvio significativo pelo método do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O SNP rs2227543 mostrou uma proteção significativa para BVA, apresentando frequência menor de homozigotos TT em pacientes do grupo controle (OR 0,25: IC 0,10 – 0,65). No entanto, a variação genética rs2227307 não demonstrou associação com a BVA.

Conclusão: Esse achado, em conjunto com a análise de estudos prévios, sugere que o polimorfismo rs2227543 de *IL-8* está associado à proteção da BVA e influencia diretamente a gravidade da BVA nessas crianças.

Palavras-chave: bronquiolite, polimorfismo, interleucina-8, sibilância.

ABSTRACT

Introduction: almost all infants present infection by respiratory syncytial virus (RSV) up to 2 years of age. However, the severity of acute viral bronchiolitis (AVB) can vary significantly. This variability may be caused by genetic and immunological factors. Previous studies have shown that RSV-infected airway contains high levels of interleukin 8 (*IL-8*). The knowledge of genetic polymorphisms associated with severe AVB may have clinical relevance, identifying patients with high-risk for severe AVB.

Methods: We included infants admitted to the pediatric emergency of *Hospital Sao Lucas (HSL) da PUCRS* with AVB, aged less than 12 months, in the period between september 2009 to september 2011; and infants of the same age who did not have had AVB, recruited from the primary care center Bom Jesus. Samples were collected from capillary blood. DNA was extracted for genotyping of two polymorphisms (SNPs rs2227543 and rs2227307) in the *IL-8* gene.

Results: In the final genetic association sample, we included 115 cases and 64 controls. There was no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The SNP rs2227543 showed significant protection for AVB, with lower frequency of homozygous TT patients in the control group (OR 0.25: CI 0.10 to 0.65). However, rs2227307 showed no association with AVB.

Conclusion: This finding, together with the analysis of previous studies, suggests that the *IL-8* polymorphism rs2227543 is associated with protection of the AVB and directly influences the severity of AVB in these infants.

Keywords: bronchiolitis, polymorphism, interleukin-8, wheezing.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Métodos e resultados para seleção de estudos de associação genética de bronquiolite viral aguda.	30
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Principais genes e polimorfismos associados à BVA.....	31
Tabela 2. Outros genes e variações genéticas associados à BVA	32

CAPÍTULO III

Tabela 1. Grupo em estudo versus controles, dados descritivos da amostra.....	52
Tabela 2. Resultados da genotipagem, frequência alélica e desvio do equilíbrio de Hardy Weinberg para os SNPs rs2227307 e rs2227543.	53
Tabela 3. Resultado da genotipagem em ambos os grupos.	54
Tabela 4. Associação de variáveis clínicas do grupo casos e a ocorrência de homozigoto TT no SNP 2- rs2227543.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AB	<i>Applied Biosystems</i>
AVB	<i>acute viral bronchiolitis</i>
BVA	bronquiolite viral aguda
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CX	<i>chemokine</i>
CT	<i>threshhold cycle</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	desvio padrão
HSL	Hospital São Lucas
IC	intervalo de confiança
IL	interleucina
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
LPS	lipopolissacarídeo
μL	microlitro(s)
ng	nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>odds ratio</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RANTES	<i>regulated upon activation, normal t cell expressed and secreted</i>

RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TLR	<i>toll like receptors</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
UTI	unidade de terapia intensiva
VDR	<i>vitamin D receptor</i>
VM	ventilação mecânica
VSR	vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	15
1.1 APRESENTAÇÃO.....	15
1.2 JUSTIFICATIVA.....	17
1.3 OBJETIVOS	18
1.3.1 Objetivo geral	18
1.3.2 Objetivos específicos.....	18
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO II.....	20
2.1 ARTIGO DE REVISÃO	21
CAPÍTULO III.....	37
3.1 ARTIGO ORIGINAL	38
CAPÍTULO IV.....	56
4.1 CONCLUSÕES.....	57

CAPÍTULO I

1.1 APRESENTAÇÃO

A bronquiolite viral aguda (BVA) é o distúrbio mais comum e a principal causa de insuficiência respiratória em lactentes com menos de 12 meses de idade, podendo gerar altos índices de hospitalizações nessa faixa etária. O vírus sincicial respiratório (VSR) é o patógeno mais comum e acomete aproximadamente 75% dos pacientes (1,2). O diagnóstico é clínico e baseado no primeiro episódio de sibilância em criança menor de 12 meses. Os sintomas mais frequentes são tosse, febre e coriza, evoluindo para dificuldade respiratória, podendo chegar à hipoxemia e necessidade de suporte de ventilação mecânica (VM) com internação em unidade de tratamento intensivo (UTI) (3,4). Ainda não há tratamento específico para bronquiolite. A terapia é basicamente de suporte, variando conforme a gravidade da infecção e do quadro clínico (3).

A gravidade da doença pode variar consideravelmente, mesmo em pacientes sem fatores de risco. A mesma pode ser avaliada por meio da oximetria e outros indicadores clínicos (tempo de uso de oxigênio, tempo de internação). Em lactentes e crianças menores, a infecção pelo VSR causa doença com gravidade variada, desde leve infecção do trato respiratório superior até grave infecção do trato respiratório inferior (5).

Alguns mediadores da resposta imune podem influenciar diretamente na resposta ao VSR, principal etiologia da doença, especialmente as interleucinas (IL) associadas ao recrutamento de neutrófilos (6). As citocinas são proteínas que modulam a função de outras células ou da própria célula que as geraram. São produzidas por diversas células, mas principalmente por linfócitos e macrófagos ativados, sendo importantes para o controle da resposta imune (7-9). Cada IL atua em um grupo específico de células, de acordo com os receptores adequados para cada uma. Esses mediadores possuem funções, principalmente, nas reações inflamatórias e citotóxicas (7). Algumas interleucinas, como por exemplo, a IL-8, exerce um papel importante na ativação e recrutamento de neutrófilos, célula mais importante na inflamação desencadeada pela BVA (10).

Assim, a variabilidade das manifestações da BVA demonstra que há diferentes fatores envolvidos na resposta de cada indivíduo à determinada infecção. Os polimorfismos genéticos são variações frequentes nas sequências de DNA (ácido desoxirribonucléico), que podem tornar o indivíduo suscetível ou não à ocorrência de determinadas doenças. Os polimorfismos da *interleucina-8 (IL-8)* estão entre as variações

genéticas conhecidas e que podem influenciar diretamente o comportamento do indivíduo em resposta à doença.

1.2 JUSTIFICATIVA

Os lactentes com infecções por vírus podem apresentar desde um quadro de resfriado comum até bronquiolite grave, com internação em unidade de tratamento intensivo (UTI), seguidos por sintomas recorrentes. Essa grande variação pode ser causada por polimorfismos genéticos, responsáveis pela diversidade humana. Os polimorfismos podem influenciar diretamente sobre fatores de risco associados às doenças comuns, além de estar relacionados com uma maior ou menor suscetibilidade para o desenvolvimento de determinadas patologias (6). O estudo dos polimorfismos de *IL-8* pode auxiliar no reconhecimento de pacientes de risco para bronquiolite grave, o que pode ter grande impacto no diagnóstico precoce e manejo desses pacientes.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

- Avaliar a associação entre polimorfismos de *IL-8* em lactentes com e sem BVA;

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a associação entre os polimorfismos genéticos de *IL-8* e a gravidade da BVA em lactentes hospitalizados;
-

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hall CB. Respiratory syncytial vírus and parainfluenza, *N Engl J Med* 2001; 344:1917-1928.
 2. Bacharier LB, Cohen R, Schweiger T, Yin-Declue H, Christie C, Zheng J, Schechtman KB, Strunk RC, Castro M. Determinants of asthma after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Jul; 130(1):91-100.
 3. Wainwright C. Acute viral bronchiolitis in children- a very common condition with few therapeutic options. *Paediatr Respir Rev* 2010; 11(1):39-45.
 4. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: recent evidence on diagnosis and management. *Pediatrics* 2010; 125(2):342-9.
 5. Simoes EAF, Estrany XC. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:S13-20.
 6. Geisler S, Lichtinghagen R, Böker KHW, Veh RW. Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinases family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. *Cell Tissue Res* 1997; 289:173-83.
 7. Male D, Roit I. Introdução ao sistema imune. IN: Roit I, Brostoff J, Male D. *Imunologia.* São Paulo; Manole, 1999. p. 1-11.
 8. Duarte ACG. Semiologia Imunológica Nutricional. In: Duarte ACG. *Mediadores imunológicos.* Axcel Books do Brasil Editora; Rio de Janeiro, 2003. p.22-36.
 9. Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins. *Patologia estrutural e funcional.* 6a ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2000; p. 45-78.
 10. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000; 55: 1023-1027.
-

CAPÍTULO II

2.1 ARTIGO DE REVISÃO

Impacto dos polimorfismos genéticos na suscetibilidade para bronquiolite aguda grave

Impact of genetic polymorphisms on severe acute bronchiolitis susceptibility

Autores

Lidiane Alves de Azeredo Leitão (1), Leonardo Araújo Pinto (2)

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

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

Currículo dos autores está disponível na Plataforma Lattes do CNPq.

Fonte financiadora: não se aplica neste artigo de revisão.

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

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

RESUMO

Objetivo: descrever, de forma sintética e quantitativa, a associação entre polimorfismos genéticos e a suscetibilidade para bronquiolite aguda grave (BA).

Métodos: Os artigos incluídos na presente pesquisa foram publicados nas bases de dados Pubmed (NCBI). A busca baseou-se em uma combinação de descritores para referir bronquiolite viral aguda e polimorfismos genéticos, sendo eles: “*bronchiolitis e polymorphisms*”.

Resultados: Foram selecionados 92 artigos referentes ao tema da pesquisa. Após seleção dos artigos mais adequados aos objetivos deste estudo, foram incluídas 34 publicações, que fazem parte das referências deste artigo de revisão. Foram encontrados 6 artigos que tratam especificamente da *IL-8*, 5 publicações sobre *TLR4*, 4 artigos referentes à *IL-10*, e outros 19 artigos apresentando polimorfismos diversos, dentre eles *RANTES*, *Receptor de vitamina D (VDR)*, *IL-4*, *TLR3*, *TLRs*, *IL-1*, *IL-13*, *IL-14*, *IL-28B*, *IL-9*, *IL-17*, *IL-18*, *CD14*, *CX3C* e *Proteína surfactante*.

Conclusão: Considerando esta revisão, observamos que 3 genes parecem ter um papel mais relevante na suscetibilidade da BVA: *IL-8*, *TLR4* e *IL-10*. Esses genes apresentaram quatro ou mais estudos de associação com resultados positivos para suscetibilidade ao VSR ou para gravidade da BVA.

ABSTRACT

Objective: To describe in a synthetic and quantitative association between genetic polymorphisms and susceptibility to severe acute bronchiolitis (AB).

Methods: Articles included in this research were published in Pubmed (NCBI). The search was based on a combination of descriptors to refer to acute bronchiolitis and genetic polymorphisms, which were: "bronchiolitis and polymorphisms".

Results: We selected 92 articles on the subject of the research, after selection of items best suited to the purposes of this study; we included 34 publications, which are part of the references in this review article. We have found six items that specifically refer to *interleukin-8*, 5 *TLR4* publications, 4 items related to *interleukin-10* and other items 19 having various polymorphisms, including *RANTES*, *Vitamin D Receptor (VDR)*, *IL-4*, *TLR3*, *TLRs*, *IL-1*, *IL-13*, *IL-14*, *IL-28B*, *IL-9*, *IL-17*, *IL-18*, *CD14*, *CX3C*, *surfactant protein*.

Conclusions: Considering the review, we found that three genes appear to have a important role in the susceptibility of AB: *IL-8*, *TLR4* and *IL-10*. These genes had four or more association studies with positive results for susceptibility to or severity of BA.

INTRODUÇÃO

A bronquiolite viral aguda (BVA) é uma das causas mais comuns de internação hospitalar na infância. O principal agente associado à BVA é o vírus sincicial respiratório (VSR). Esse vírus infecta a maioria das crianças, causando desde infecções do trato respiratório superior até bronquiolite grave, necessitando de cuidados intensivos. Vinte a 30% das crianças desenvolvem infecções leves, com coriza, tosse, crepitações, sibilos e dispnéia. Um por cento das crianças saudáveis necessita de hospitalização, mas ela é mais comum em grupos de risco: recém-nascidos com doenças respiratórias crônicas, cardíacas, neurológicas ou imunológicas e os nascidos prematuramente, particularmente aqueles com displasia broncopulmonar (DBP) (1). Cerca de metade das crianças com infecção do trato respiratório inferior passa a ter episódios repetidos de sibilância, até que atinja a idade escolar (2-4). Entretanto, muitos pacientes sem fatores de risco identificados também necessitam de hospitalizações.

Vários mecanismos potenciais têm sido sugeridos sobre a forma como a bronquiolite pode estar associada a fatores imunológicos, mecanismos alérgicos, suscetibilidade do sexo masculino e predisposição genética (5). Há cada vez mais evidências, a partir de estudos clínicos e genéticos (6,7), de que a IL-8 desempenha um papel importante no desenvolvimento da BVA, onde a suscetibilidade genética à infecção por VSR é predominantemente associada a genes da imunidade inata (8). De acordo com a evidência atual, os fatores genéticos e ambientais determinam o tipo de resposta imunitária à bronquiolite (6). Além disso, essa resposta pode afetar o desenvolvimento de mecanismos de controle na regulação de doenças respiratórias (9).

Até o momento, poucos estudos têm investigado o impacto de polimorfismos genéticos na bronquiolite aguda grave. Assim, o objetivo do presente estudo foi apresentar uma revisão de artigos sobre evidências da influência genética de polimorfismos na doença respiratória aguda.

MÉTODOS

Os artigos incluídos na presente pesquisa foram publicados na base de dados Pubmed (NCBI). A busca baseou-se em uma combinação para referir bronquiolite viral aguda e polimorfismos genéticos, sendo eles: “*bronchiolitis e polymorphisms*”. A busca foi limitada à seleção de artigos originais, em inglês, com fator de impacto > 1,0, termos referentes à pesquisa e artigos publicados desde 2000.

A relação dos artigos informou dados sobre a publicação: autores, revista, ano de publicação e fator de impacto da revista. As buscas foram realizadas em março e abril de 2013. Os artigos foram avaliados de maneira independente pelo autor, e os que não estavam diretamente relacionados ao tema proposto foram excluídos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, foram selecionados 92 artigos, avaliados através do título e resumo, excluindo estudos que não preencheram os critérios de inclusão. Após leitura e seleção dos artigos mais adequados aos objetivos deste trabalho, foram avaliadas 34 publicações, que fazem parte das referências deste artigo de revisão (figura 1).

Foram encontrados 6 artigos que tratavam especificamente da associação entre *IL-8* e a BVA, 5 publicações sobre *Toll-like Receptor 4 (TLR4)* e 4 artigos referentes ao gene de *IL-10*. Além disso, outros 19 artigos foram encontrados, apresentando polimorfismos em genes diversos: *RANTES*, *Receptor de Vitamina D (VDR)*, *IL-4*, *TLR3*, *TLRs*, *IL-1*, *IL-13*, *IL-14*, *IL-28B*, *IL-9*, *IL-17*, *IL-18*, *CD14*, *CX3C* e *Proteína surfactante* (tabela 1).

A associação mais frequentemente descrita refere-se à influência de polimorfismos de *IL-8* em associação com a bronquiolite. Em estudo prévio, Hull et al (6) questionaram se a evolução clínica da infecção pelo VSR é determinada por fatores genéticos (identificação de um polimorfismo comum da região promotora de *IL-8*) e verificaram sua associação com a suscetibilidade à bronquiolite por VSR. Foram utilizadas como marcadores de gravidade a terapia com oxigênio e a ventilação mecânica. O polimorfismo identificado como T-251A demonstrou que portadores do alelo A têm risco aumentado em

2 vezes para o desenvolvimento da bronquiolite grave. A análise dos casos de bronquiolite por VSR mostrou que o alelo A *IL-8* T-251A está significativamente associado à gravidade da doença. Posteriormente, Hull et al (7) realizaram um outro estudo, a partir de um conjunto de famílias, a fim de reproduzir a constatação do estudo citado anteriormente. Com o objetivo de explorar a causa genética, foram identificados nove polimorfismos de *IL-8*. O estudo foi realizado com lactentes com bronquiolite, ambos os pais, doadores de sangue e recém-nascidos no mesmo hospital. No que se refere à geração dos haplótipos africanos, foram recrutadas 61 famílias na Gâmbia. Ao considerar o grupo de famílias informativas, a proporção em que o alelo *IL-8* T-251A foi transmitido aos acometidos foi de 62%, uma frequência significativamente maior do que o esperado. Não existem estudos que associaram outros polimorfismos de *IL-8* a BVA em lactentes.

Em relação à identificação de um haplótipo associado à bronquiolite, Hull (10) desenvolveu um estudo de caso-controle. Foi realizada a distribuição de 63 SNPs através de 660 kb de acompanhamento de *IL-8*. Os dados do estudo confirmam que existe uma suscetibilidade à bronquiolite no *locus* de *IL-8*. Por outro lado, Hacking (11) investigou a base funcional para a associação dos polimorfismos de *IL-8* (251A / 396 G / 781T / 1238 delA / 1633T / 2767T) e a gravidade da bronquiolite. O estudo concluiu, portanto, que não existe diferença significativa entre o alelo -251T, encontrado no haplótipo 1 e alelo -251A, encontrado no haplótipo 2. Outro estudo, realizado na Alemanha (12) investigou o papel de quatro polimorfismos em *IL-8*, dentre eles o SNP rs4073 (T-251A), mostrado anteriormente. O estudo encontrou associação significativa com a asma para os 4 polimorfismos, especialmente com C781T. Este estudo demonstra que a base genética da asma e da bronquiolite podem apresentar efeitos opostos sobre o desenvolvimento das doenças. O mesmo alelo A do SNP rs4073, que traz suscetibilidade à bronquiolite por VSR, pode determinar proteção contra a asma.

Além disso, os genes *IL-8* e *IL-8RA* foram testados por Puthothu et al (9) na população alemã, a fim de identificar sua relação com a asma e outras infecções graves causadas por VSR. Para a genotipagem, foram eleitos dois polimorfismos de *IL-8*, T-251A e C-781T, e três aminoácidos variantes em *IL-8RA*. Uma associação do polimorfismo de *IL-8* C-781T com asma foi encontrada. Em relação à associação com o segundo polimorfismo T-251A, o resultado não foi estatisticamente significativo. Ao avaliar outros polimorfismos, não houve associação com asma brônquica ou infecção grave por VSR.

Este estudo não encontrou que *IL-8* tivesse um papel importante no desenvolvimento de graves infecções por VSR na população. Dessa forma, podemos considerar o papel de *IL-8* na BVA ainda como um efeito controverso. Faltam estudos de replicação em populações de diferentes origens para confirmar o efeito e identificar os polimorfismos mais fortemente associados a BVA.

Em referência à importância do complexo *TLR4/CD14* na iniciação da imunidade inata ao VRS, um estudo (13) investigou a associação das mutações (*TLR4* Asp299Gly e Thr399Ile) e o polimorfismo CD14/-159 em crianças hospitalizadas com bronquiolite grave por VSR. O resultado demonstrou que a bronquiolite grave por VSR está associada com as mutações comuns de *TLR4* (Asp299Gly e / ou Thr399Ile), mas não com o polimorfismo CD14/-159. Além disso, segundo Tal G. et al, o estudo levanta a questão do papel de polimorfismos de *TLR4* no desenvolvimento de asma subsequente. Dessa forma, ao considerar os polimorfismos de *TLR4*, em um estudo recente (14), esses foram associados não apenas com respostas inflamatórias sistêmicas, mas também com aumento do risco para a bronquiolite grave causada pelo vírus sincicial respiratório. Após a exposição bacteriana e/ou viral, os polimorfismos de *TLR4* 299 *Gli* e 399 *Ile* apresentaram redução da função do receptor em ambas as linhas de células epiteliais e em monócitos de indivíduos com esses alelos *TLR4*. Segundo Tulic, essa disfunção pode ser atribuída à expressão reduzida de *TLR4*, e, assim, a fraca resposta imune, inata, resultante pode contribuir para a suscetibilidade aumentada às infecções nesses indivíduos.

Outro estudo (15) realizado com 129 crianças hospitalizadas por bronquiolite durante os primeiros 6 meses de vida analisou a associação de polimorfismos de *TLR4* e sua relação com a infecção recorrente e sibilância. Não houve confirmação da associação à infecções ou sibilância nesses casos. Nesse contexto, um estudo de associação genética realizado na Finlândia (16), numa população geneticamente homogênea, investigou a relação entre o polimorfismo de *TLR4* e a suscetibilidade à infecção por VSR. Não houve confirmação dos resultados esperados da associação entre o polimorfismo e a suscetibilidade à bronquiolite por VSR. Porém, após a análise post hoc das epidemias isoladas, encontraram-se evidências de associação entre polimorfismo genético de *TLR4*, que pode influenciar a suscetibilidade à BVA. Dessa forma, alguns polimorfismos de *TLR4* têm sido avaliados como marcadores importantes na suscetibilidade à bronquiolite. Um estudo realizado por Douville (17) analisou o impacto de polimorfismos de *TLR4*, SNPs

Asp299Gly e Thr399Ile na produção de citocinas em pacientes pediátricos. O estudo demonstrou que, independentemente do haplótipo, a resposta do grupo não determinou claramente a resposta a ambos os estímulos, LPS e VSR, mesmo quando as crianças apresentaram um fenótipo clínico de asma, ou nos casos em que apresentavam história prévia de bronquiolite.

Em relação à associação de polimorfismos de *IL-10* com a bronquiolite, o resultado de um estudo de caso-controle demonstrou que, ao comparar heterozigotos com pacientes homozigotos para o alelo *IL-10* C-592A, esses últimos apresentaram um risco aumentado de hospitalização por bronquiolite. Além disso, houve associação significativa entre a bronquiolite por VSR e o alelo *IL-10* C-592A, ao avaliar crianças menores de 6 meses (18). Contudo, a hipótese de que os polimorfismos de *IL-10* desempenham um papel crítico no processo da resposta imune, incluindo o desenvolvimento de chiado e asma na infância, vem sendo discutida. Foi realizado um estudo com o objetivo de identificar o papel da *IL-10* na bronquiolite, utilizando métodos de associação genética. Para tanto, foram mapeados 8 polimorfismos de *IL-10* (19). Não foi encontrada associação significativa com a bronquiolite em nenhum dos polimorfismos. O estudo destaca a dificuldade em afirmar se a produção aumentada ou diminuída de *IL-10* está associada com a gravidade da BVA. Segundo o autor, a variação na produção de *IL-10* parece estar associada à hereditariedade.

Outro estudo, realizado por Helminen (20), avaliou se o polimorfismo de *IL-10* G-1082A está associado à presença de bronquiolite. No resultado encontrado, houve uma diferença significativa no alelo de *IL-10* G-1082A, quando as crianças infectadas com um único vírus, exceto VSR, foram comparadas com o grupo controle. As crianças infectadas por rinovírus tiveram menor propensão a apresentar o alelo G em -1082 de *IL-10*. Resultados de trabalhos anteriores em conjunto com os achados deste estudo sugerem que os pacientes homozigotos para o polimorfismo de *IL-10* podem apresentar maior risco de desenvolver asma, especialmente quando o agente etiológico detectado for o rinovírus. Em relação à sibilância pós bronquiolite, foi realizado um estudo (21) a fim de avaliar a relação de polimorfismos de *IL-10* com o quadro recorrente. Esse estudo demonstra que polimorfismos *IL-10* influenciam a expressão de IL-19/IL-20, o risco de sibilância em lactentes com infecção por VSR. Os mecanismos pelos quais essas interleucinas levam a alterações nas vias aéreas ainda não estão completamente esclarecidos.

Considerando esta revisão, observamos que 3 genes parecem ter um papel mais relevante na suscetibilidade da BVA: *IL-8*, *TLR4* e *IL-10*. Esses genes apresentaram quatro ou mais estudos de associação com resultados positivos para suscetibilidade ao VSR ou para gravidade da BVA. É importante ressaltar que não foram encontrados estudos sobre polimorfismos de *IL-8*, *TLR4* e *IL-10* em populações latino-americanas.

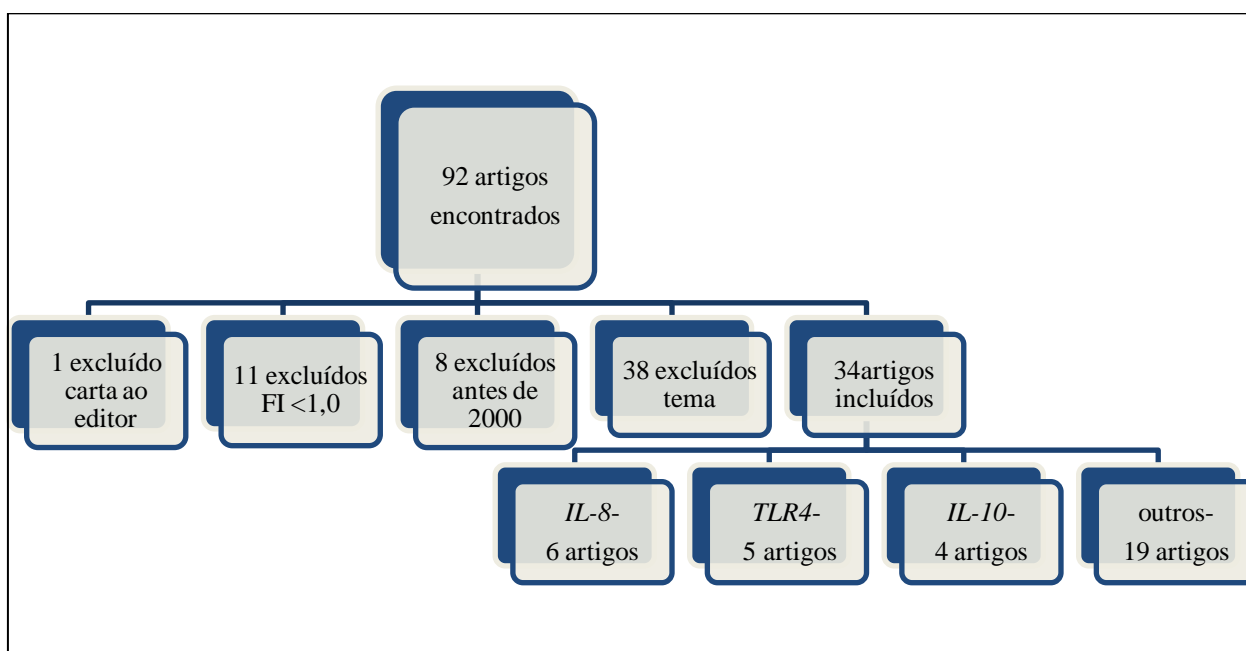


Figura 1. Métodos e resultados para seleção de estudos de associação genética de bronquiolite viral aguda.

Tabela 1. Principais genes e polimorfismos associados à BVA

Genes	SNPs	Nº de publicações	Referências
<i>IL-8</i>	# -A251T, C781T, C1633T, A2767T # G396T/ T781C/ delA1238insA/ T1633C / T2767A	6	Puthothu B. Clin Mol Allergy. 2006 Heinzmann A. J All Clin Immunol. 2004 Hacking D, Genes Immun. 2004 Hull J. Hum Genet. 2004 Hull J. Am J Hum Genet. 2001 Hull J. Thorax. 2000
<i>TLR4</i>	# Asp299Gly e Thr399Ile # A896G	5	Douville RN. PLoS One. 2010 Löfgren J. Pediatr Pulmonol. 2010 Tulic MK, 2007 Nuolivirta K. J Immunol. 2007 Tal G. J Infect Dis. 2004
<i>IL-10</i>	# A-592C # G-1082A # rs3024505, 3024500,1554286,1518110,1800872, 1800871,1800896,1800890	4	Ermers MJ. Pediatr Res. 2011 Helminen M. Pediatr Pulmonol. 2008 Wilson J. J Infect Dis. 2005 Hoebee B. J Infect Dis. 2004

Tabela 2. Outros genes e variações genéticas associados à BVA

Genes	SNPs	Nº de publicações	Referências
<i>RANTES</i> ,	# A-403G, G-28C, e TIn1.1C	19	Hattori S. Jpn J Infect Dis. 2011
<i>VDR</i> , <i>IL-4</i> ,	# rs10735810, rs 4986790, rs 4986791,		Tian M. Eur J Pediatr. 2009
<i>TLR3</i> ,	rs 11688		Amanatidou V. Pediatr Infect Dis J. 2008
<i>TLRs</i> ,	# rs 731236 e rs 10735810		Kresfelder TL. J Med Virol. 2011
<i>IL-1</i> , <i>IL-13</i> ,	# C-590T e <i>IL-4</i> Ralpha		Roth DE. J Infect Dis. 2008
<i>IL-14</i> ,	# L412F (rs3775291)		Hoebee B. J Infect Dis. 2003
<i>IL-28B</i> ,	# rs1921622		Nuolivirta K Pediatr Infect Dis J. 2012
<i>IL-9</i> ,	# rs2243250		Mailaparambil B. Dis Markers. 2008
<i>IL-17</i> ,	# rs12979860 e rs8099917		Faber TE. PLoS One. 2012
<i>IL-18</i> ,	# rs2069885		Forton JT. Thorax. 2009
<i>CD1</i> ,	# rs2275913		Scagnolari C. Virus Res. 2012
<i>CX3C</i> ,	# rs187238		Schuurhof A. Pediatr Pulmonol. 2010
<i>Proteína surfactante</i>	# T280M		Chen J. J Clin Immunol. 2010
	# Met11Thr		Puthothu B. Pediatr Infect Dis J. 2007
	# SP- A1 e SP- A2		Inoue Y. J Infect Dis. 2007
	# ICAM-1, VCAM-1 e E-selectin		Amanatidou V. Pediatr Infect Dis J. 2006
			Lahti M. Pediatr Res. 2002
			Löfgren J. J Infect Dis. 2002
			Krueger M. Int J Immunogenet. 2006

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Drysdale SB, Milner AD, Greenough A. Respiratory syncytial virus infection and chronic respiratory morbidity - is there a functional or genetic predisposition? *Acta Paediatr.* 2012 Nov; 101(11):1114-20.
 2. Stein RT, Sherill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13. *Lancet.* 1999; 354:541–545.
 3. Perez-Yarza EG, Moreno A, Lazaro P, Mejias A, Ramilio O. The association between respiratory syncytial virus infection and the development of childhood asthma: a systematic review of the literature. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26:733–739.
 4. Henderson J, Hilliard TN, Sherriff A, Stalker D, Al Shammari N, et al. Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005; 16: 386–392.
 5. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 633–9.
 6. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000; 55:1023–1027.
 7. Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, Kwiatkowski D. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet.* 2001; 69: 413–9.
 8. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, van't Slot R, Wijmenga C, Goeman J, Kimpen JL, van Houwelingen HC, KimmanTG, Hoebee B. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis.* 2007; 196(6):826-34.
 9. Puthothu B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clin Mol Allergy.* 2006; 17; 4:2.
 10. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Sharland M, Moore C, Hanchard N, Kwiatkowski DP. Haplotype mapping of the bronchiolitis susceptibility locus near IL8. *Hum Genet.* 2004;114(3):272-9.
-

11. Hacking D, Knight JC, Rockett K, Brown H, Frampton J, Kwiatkowski DP, Hull J, Udalova IA. Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease-susceptibility. *Genes Immun.* 2004;5(4):274-82.
 12. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(3):671-6.
 13. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, Oron A, Itskovich S, Ballin A, Houry S, Beigelman A, Lider O, Rechavi G, Amariglio N. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis.* 2004; 189(11):2057-63.
 14. Tulic MK, Hurrelbrink RJ, Prêle CM, Laing IA, Upham JW, Le Souef P, Sly PD, Holt PG. TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2007; 179(1):132-40.
 15. Nuolivirta K, Hurme M, Halkosalo A, Koponen P, Korppi M, Vesikari T, Helminen M. Gene polymorphism of IFNG +874 T/A and TLR4 +896 A/G and recurrent infections and wheezing in toddlers with history of bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28(12):1121-3.
 16. Löfgren J, Marttila R, Renko M, Rämetsä M, Hallman M. Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism in respiratory syncytial virus epidemics. *Pediatr Pulmonol.* 2010; 45(7):687-92.
 17. Douville RN, Lissitsyn Y, Hirschfeld AF, Becker AB, Kozyrskyj AL, Liem J, Bastien N, Li Y, Victor RE, Sekhon M, Turvey SE, HayGlass KT. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: no impact on human immune responsiveness to LPS or respiratory syncytial virus. *PLoS One.* 2010 ;5(8):e12087.
 18. Hoebee B, Bont L, Rietveld E, van Oosten M, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJ, Neijens HJ, Kimpen JL, Kimman TG: Influence of promoter variants of interleukin-10, interleukin-9, and tumor necrosis factor- α genes on respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15;189(2):239-47.
 19. Wilson J, Rowlands K, Rockett K, Moore C, Lockhart E, Sharland M, Kwiatkowski D, Hull J. Genetic variation at the IL10 gene locus is associated with severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2005;15;191(10):1705-9.
 20. Helminen M, Nuolivirta K, Virta M, Halkosalo A, Korppi M, Vesikari T, Hurme M. IL-10 gene polymorphism at -1082 A/G is associated with severe rhinovirus bronchiolitis in infants. *Pediatr Pulmonol.* 2008; 43(4):391-5.
 21. Ermers MJ, Janssen R, Onland-Moret NC, Hodemaekers HM, Rovers MM, Houben ML, Kimpen JL, Bont LJ. IL10 family member genes IL19 and IL20 are associated
-

- with recurrent wheeze after respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Res.* 2011; 70(5):518-23.
22. Hattori S, Shimojo N, Mashimo T, Inoue Y, Ono Y, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Suzuki Y. Relationship between RANTES polymorphisms and respiratory syncytial virus bronchiolitis in a Japanese infant population. *Jpn J Infect Dis.* 2011; 64(3):242-5.
 23. Tian M, Liu F, Wen GY, Shi SY, Chen RH, Zhao DY. Effect of variation in RANTES promoter on serum RANTES levels and risk of recurrent wheezing after RSV bronchiolitis in children from Han, Southern China. *Eur J Pediatr.* 2009; 168(8):963-7.
 24. Amanatidou V, Sourvinos G, Apostolakis S, Neonaki P, Tsilimigaki A, Krambovitis E, Spandidos DA. RANTES promoter gene polymorphisms and susceptibility to severe respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27(1):38-42.
 25. Kresfelder TL, Janssen R, Bont L, Pretorius M, Venter M. Confirmation of an association between single nucleotide polymorphisms in the VDR gene with respiratory syncytial virus related disease in South African children. *J Med Virol.* 2011; 83(10):1834-40.
 26. Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of acute lower respiratory tract infection in early childhood. *J Infect Dis.* 2008; 197(5):676-80.
 27. Hoebee B, Rietveld E, Bont L, Oosten Mv, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJ, Neijens HJ, Kimpen JL, Kimman TG. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis.* 2003; 187(1):2-11.
 28. Nuolivirta K, He Q, Vuononvirta J, Koponen P, Helminen M, Korppi M. Toll-like receptor 3 L412F polymorphisms in infants with bronchiolitis and postbronchiolitis wheezing. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31(9):920-3.
 29. Mailaparambil B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Polymorphisms of toll like receptors in the genetics of severe RSV associated diseases. *Dis Markers.* 2008; 25(1):59-65.
 30. Faber TE, Schuurhof A, Vonk A, Koppelman GH, Hennis MP, Kimpen JL, Janssen R, Bont LJ. IL1RL1 gene variants and nasopharyngeal IL1RL - a levels are associated with severe RSV bronchiolitis: a multicenter cohort study. *PLoS One.* 2012; 7(5): e34364.
 31. Forton JT, Rowlands K, Rockett K, Hanchard N, Herbert M, Kwiatkowski DP, Hull J. Genetic association study for RSV bronchiolitis in infancy at the 5q31 cytokine cluster. *Thorax.* 2009; 64 (4):345-52.
-

-
32. Scagnolari C, Midulla F, Riva E, Monteleone K, Solimini A, Bonci E, Cangiano G, Papoff P, Moretti C, Pierangeli A, Antonelli G. Evaluation of interleukin 28B single nucleotide polymorphisms in infants suffering rombronchiolitis. *Virus Res.* 2012; 165(2):236-40.
 33. Schuurhof A, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers H, van Houwelingen HC, Kimman TG, Hoebee B, Kimpen JL, Janssen R. Interleukin-9 polymorphism in infants with respiratory syncytial virus infection: an opposite effect in boys and girls. *Pediatr Pulmonol.* 2010; 45(6): 608-13.
 34. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, Ren L, Wang L, Fu Z, Yang X, Liu E. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *J Clin Immunol.* 2010; 30(4):539-45.
 35. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinze J, Weckmann M, Heinzmann A. Interleukin IL-18 polymorphism 133C/G is associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26(12):1094-8.
 36. Inoue Y, Shimojo N, Suzuki Y, Campos Alberto EJ, Yamaide A, Suzuki S, Arima T, Matsuura T, Tomiita M, Aoyagi M, Hoshioka A, Honda A, Hata A, Kohno Y. CD14 - 550 C/T, which is related to the serum level of soluble CD14, is associated with the development of respiratory syncytial virus bronchiolitis in the Japanese population. *J Infect Dis.* 2007; 195(11):1618-24.
 37. Amanatidou V, Sourvinos G, Apostolakis S, Tsilimigaki A, Spandidos DA. T280M variation of the CX3C receptor gene is associated with increased risk for severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25(5):410-4.
 38. Lahti M, Lofgren J, Marttila R, Renko M, Klaavuniemi T, Haataja R, Ramet M, Hallman M. Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res.* 2002; 51(6):696-9.
 39. Löfgren J, Rämét M, Renko M, Marttila R, Hallman M. Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis.* 2002; 185(3):283-9.
 40. Krueger M, Puthothu B, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Genetic polymorphisms of adhesion molecules in children with severe RSV-associated diseases. *Int J Immunogenet.* 2006; 33(4):233-5.
-

CAPÍTULO III

3.1 ARTIGO ORIGINAL

Relação entre polimorfismos de *IL-8* e a gravidade da bronquiolite viral aguda

Autores

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

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

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

3 Bioquímica, Professora da Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

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

Currículo dos autores está disponível na Plataforma Lattes do CNPq.

Fonte financiadora: FAPERGS

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

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

Resumo

Introdução: Até os 2 anos de idade, praticamente todos os lactentes apresentam infecção por vírus sincicial respiratório (VSR). Entretanto, a gravidade da bronquiolite viral aguda (BVA) pode variar significativamente. Essa grande variação pode ser causada por fatores genéticos e imunológicos. Estudos prévios indicam que vias aéreas infectadas por VSR contêm níveis elevados de *IL-8*. O conhecimento de polimorfismos genéticos associados à BVA grave pode ter grande relevância clínica, identificando pacientes de alto risco.

Métodos: Foram incluídos lactentes internados na emergência pediátrica do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS com BVA, idade menor de 12 meses, no período entre setembro de 2009 a setembro de 2011, e lactentes da mesma faixa etária que não apresentaram BVA, recrutados junto ao Centro de Saúde Bom Jesus (CSBJ). Foram coletadas amostras de sangue capilar. Desse material, foi extraído DNA, utilizado para genotipagem de 2 polimorfismos (SNPs rs2227543 e rs2227307) do gene *IL-8*.

Resultados: Fazem parte da análise final do estudo de associação genética 115 casos e 64 controles. Não foi observado nenhum desvio significativo pelo método do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O SNP rs2227543 mostrou uma proteção significativa para BVA, apresentando frequência menor de homozigotos TT em pacientes do grupo controle (OR 0,25; IC 0,10 – 0,65). No entanto, a variação genética rs2227307 não demonstrou associação com a BVA.

Conclusão: Esse achado, em conjunto com a análise de estudos prévios, sugere que o polimorfismo rs2227543 de *IL-8* está associado à proteção da BVA e influencia diretamente a gravidade da BVA nessas crianças.

Palavras-chave: bronquiolite, polimorfismo, interleucina-8, sibilância.

Abstract

Introduction: Almost all infants present infection by respiratory syncytial virus (RSV) up to 2 years of age. However, the severity of acute viral bronchiolitis (AVB) can vary significantly. This variability may be caused by genetic and immunological factors. Previous studies have shown that RSV-infected airway contains high levels of interleukin 8 (*IL-8*). The knowledge of genetic polymorphisms associated with severe AVB may have clinical relevance, identifying patients with high-risk for severe AVB.

Methods: We included infants admitted to the pediatric emergency of *Hospital Sao Lucas (HSL) da PUCRS* with AVB, aged less than 12 months, in the period between September 2009 to September 2011; and infants of the same age who did not have had AVB, recruited from the primary care center Bom Jesus. Samples were collected from capillary blood. DNA was extracted for genotyping of two polymorphisms (SNPs rs2227543 and rs2227307) in the *IL-8* gene.

Results: In the final genetic association sample, we included 115 cases and 64 controls. There was no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The SNP rs2227543 showed significant protection for AVB, with lower frequency of homozygous TT patients in the control group (OR 0.25: CI 0.10 to 0.65). However, rs2227307 showed no association with AVB.

Conclusion: This finding, together with the analysis of previous studies, suggests that the *IL-8* polymorphism rs2227543 is associated with protection of the AVB and directly influences the severity of AVB in these infants.

Keywords: bronchiolitis, polymorphism, interleukin-8, wheezing.

Introdução

A bronquiolite viral aguda (BVA) é uma doença inflamatória aguda que acomete o trato respiratório inferior, ocasionando obstrução das vias aéreas de pequeno calibre. O diagnóstico de bronquiolite é clínico e baseado em uma história de coriza, febre, tosse e sibilância (1). A BVA é iniciada por uma infecção das vias aéreas superiores, causada por vírus sazonais, sendo o mais comum o vírus sincicial respiratório (VSR) em até 75% dos casos (1,2,3).

A BVA é a causa mais comum de internação hospitalar nos primeiros 12 meses de vida (1,2). Nos EUA, a bronquiolite grave é a causa mais frequente de hospitalização infantil, com custos estimados em mais de 543 milhões de dólares por ano (4-7). No Brasil, a BVA é o diagnóstico infantil mais comum de internações durante os meses de outono e inverno. As epidemias são anuais, e os surtos epidêmicos se estendem por aproximadamente cinco meses. No Rio Grande do Sul, poucos estudos avaliaram a incidência dessas infecções respiratórias; nas estações de outono e inverno, os hospitais apresentam dificuldades com vagas, resultando, muitas vezes, em atendimento inadequado à população e elevados custos para a saúde pública (8). Além disso, a avaliação da incidência e o estudo da epidemiologia dos vírus respiratórios, bem como o reconhecimento dos fatores de risco para bronquiolite grave, são importantes para o melhor entendimento da situação clínica dos pacientes com BVA.

A gravidade da doença é extremamente variável, e os fatores que influenciam não são totalmente estabelecidos. A resposta do hospedeiro ao vírus e os polimorfismos genéticos que modificam a resposta imune podem ser um fator relevante na determinação da gravidade da BVA, demonstrando que há diferentes fatores genéticos e imunológicos envolvidos na resposta de cada indivíduo à infecção. Os polimorfismos genéticos são variações frequentes nas sequências de DNA (ácido desoxirribonucléico) entre indivíduos normais (9). Entre os fatores genéticos, destaca-se o papel da *IL-8*, que pode influenciar diretamente na resposta do paciente à doença (10).

Um estudo prévio demonstrou a primeira evidência de suscetibilidade genética determinante para a bronquiolite por VSR. Esse estudo identificou que mais da metade da população do Reino Unido é portadora para o polimorfismo rs4073. Esse trabalho demonstrou uma tendência para o aumento da produção de *IL-8* em associação com o alelo

de *IL-8* -251A. A análise dos casos de bronquiolite mostrou que o SNP rs4073 está significativamente associado à gravidade da doença (10).

O objetivo do presente estudo foi comparar a frequência de polimorfismos de *IL-8* em lactentes com e sem BVA, e avaliar a associação entre os polimorfismos genéticos de *IL-8* e a gravidade da BVA em lactentes.

Metodologia

Delineamento do estudo

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

População e amostra

A amostra do estudo foi selecionada na emergência pediátrica do Hospital São Lucas (HSL), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Foram incluídas no estudo todas as crianças internadas, admitidas com diagnóstico de BVA. O grupo controle, sem BVA, eram lactentes que procuraram a puericultura ou o setor de imunização do Centro de Saúde Bom Jesus (CSBJ). Em um estudo de associação genética, quando consideramos uma frequência alélica de 0,04 (40%), força de associação com OR=2, poder de 90% e α de 0,001, o número total estimado é de 177 pacientes (11).

Critérios de Inclusão

No que se refere aos critérios para o grupo casos, destacamos: 1. Pacientes internados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Hospital São Lucas da PUCRS com entrada na emergência pediátrica, de setembro de 2009 a Setembro de 2011; 2. Pacientes com suspeita clínica de BVA (primeiro episódio de sibilância, acompanhado de infecções de vias aéreas superiores); 3. Lactentes menores de 12 meses de idade e 4. Necessidade de

internação hospitalar (em enfermaria ou sala de observação). Inicialmente, esses pacientes foram selecionados para um ensaio clínico que apresentou resultados negativos (12).

Para o grupo controle, foram selecionados lactentes que procuraram a consulta de revisão (puericultura) ou imunização no CSBJ, sem história prévia de internação por sibilância.

Crítérios de exclusão:

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

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A assinatura do termo de consentimento foi obtida junto ao responsável legal da criança, sujeito da pesquisa. O responsável autorizou a participação do paciente antes de qualquer procedimento. A identidade de todos os participantes da pesquisa foi mantida em sigilo. A pesquisa foi iniciada após a avaliação e a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS (09/04678) e da Secretaria Municipal de Saúde (controles).

Procedimentos

O protocolo de internação (casos) incluiu isolamento respiratório e coleta de secreção nasofaríngea de todos os pacientes com BVA. Com esse material, foi realizada imunofluorescência direta (para vírus influenza, parainfluenza, adenovírus e vírus sincicial respiratório). Uma parte desse material foi armazenada para pesquisas com reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, incluindo pesquisa para bactérias: *Mycoplasma*

pneumoniae, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis* e vírus: vírus sincicial respiratório, metapneumovírus e rínovírus.

A coleta de sangue foi planejada juntamente com o médico assistente, para que fosse efetuada em momento oportuno, preferencialmente quando necessária a coleta de sangue para realização de exames laboratoriais solicitados pela equipe médica. As amostras de sangue foram armazenadas através do *FTA Classic Card* (Whatman, Florham Park, USA) no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS. Desse material, foi extraído DNA, utilizado para o estudo relacionado aos polimorfismos do gene *IL-8*. Em nenhum momento, foram investigados outros fenótipos, as amostras congeladas serviram exclusivamente para os estudos relacionados à gravidade da doença e risco de sibilância. A gravidade da doença foi avaliada pelo tempo de internação, tempo de uso de oxigênio e tempo médio de sibilância durante a internação hospitalar.

Seleção dos polimorfismos de *IL-8*

Os polimorfismos de *IL-8* foram inicialmente rastreados, utilizando-se a base de dados da plataforma Hapmap (versão 28.0), a fim de selecionar as variações genéticas mais frequentes, descritas em populações caucasianas (13,14). Com o suporte dessa base de dados, identificamos os SNPs rs2227543 e rs2227307, com frequência em populações caucasianas de 0,30 e 0,42 respectivamente. Considerando o alto grau de *linkage disequilibrium* entre SNPs de *IL-8*, pode-se considerar que esses 2 polimorfismos representam todas as variações frequentes do gene.

Extração de DNA

A extração de DNA ocorreu a partir de amostras de sangue capilar, realizada em ambos os grupos (casos e controles) e armazenada em FTA card. O procedimento foi realizado com o uso de caneta própria para extração - *Harris Uni-core 1.25mm Punch* (Whatman, Florham Park, USA), para retirada das amostras de sangue. A extração foi realizada utilizando os reagentes: *FTA Purification Reagent* (Whatman), Tampão Tris-

EDTA (TE) para lavagem da amostra e, em seguida, o material foi aquecido a 60° por 30 minutos com 20µl de água, *Nuclease free* (Applied Biosystems-AB, Carlsbad, Califórnia,) utilizando termociclador, PTC-100™, (MJ Research, Canada, USA), conforme orientação do fabricante.

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

Genotipagem

A genotipagem foi realizada com o objetivo de identificar os polimorfismos de interesse. Foram utilizados 100ng de DNA genômico na reação de PCR em tempo real para identificação dos SNPs. A *genotyping master mix*, catálogo 4371355 (AB), e os iniciadores da *IL-8, primer SNP genotyping assays* (AB) foram usados no processo de genotipagem, com o suporte do equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (AB), e os dados obtidos da amplificação (*threshold cycle- CT*) foram analisados pelo programa *StepOne*. O resultado foi expresso em homocigoto frequente, heterocigoto, homocigoto raro ou indeterminado. Os indeterminados foram excluídos do estudo.

Análise Estatística

A amostra do estudo foi constituída de todas as crianças com BVA e de um grupo-controle. A análise foi descritiva, utilizando testes de proporções, descrições em média (desvio padrão) e mediana (intervalo interquartil), conforme distribuição das variáveis. A associação entre as variáveis categóricas e desfechos dicotômicos foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. Associações entre variáveis categóricas e desfechos contínuos foram analisadas pelo teste t de Student. As análises foram realizadas com os programas SPSS (versão 17.0) e Haploview (versão 4.2). Todos os testes foram bidirecionais, e as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

Resultados

Neste estudo, foram incluídos 127 pacientes com BVA e 82 controles, porém, fazem parte da análise final do estudo de associação genética 115 casos e 64 controles, totalizando 179 pacientes, que tinham amostras de DNA disponíveis para o estudo. Os pacientes com BVA e os controles apresentavam média de idade de 3,4 e 12,8 meses, respectivamente. A distribuição na variável sexo foi de 56,5% para o sexo masculino no grupo casos e 40,0% para o sexo masculino nos controles (tabela 1).

Inicialmente, dois polimorfismos foram genotipados na população do estudo. A taxa de sucesso da genotipagem foi de 99,4%. Não foi observado nenhum desvio significativo pelo método do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (tabelas 2). A frequência do alelo raro foi de 0,36 para o polimorfismo rs2227307 e 0,32 para a variante rs2227543.

O SNP rs2227543 mostrou uma associação significativa para proteção de BVA, apresentando frequência significativamente maior do alelo homozigoto TT entre os pacientes do grupo controle (OR 0,25 e IC 0,10 - 0,65). No entanto, a variação genética rs2227307 não demonstrou associação significativa para a BVA (tabela 3).

Além disso, em uma subanálise para o SNP rs2227543, observamos diferença expressiva, ao comparar tempo de internação, uso de oxigênio e sibilância dos pacientes somente entre o grupo de casos (tabela 4). Com relação às variáveis clínicas, observamos que os pacientes homozigotos para o alelo TT apresentaram tempo médio de internação menor, se comparados com pacientes de outros genótipos, 5,25 e 8,63 dias, respectivamente. Ao analisar o tempo de oxigenioterapia, a duração média foi de 4,25 dias, ou seja, uma redução de praticamente metade do tempo de tratamento com oxigênio administrado nos pacientes heterozigotos ou homozigotos CC. Verificou-se que o tempo médio de sibilância durante a internação hospitalar foi de 3,75 dias para homozigotos TT e de 6,68 para outros genótipos.

Discussão

Neste trabalho, ao avaliar o grupo de pacientes internados com BVA, especificamente no que se refere ao polimorfismo rs2227543, podemos observar diferença considerável ao comparar as variáveis: tempo de internação, uso de oxigênio e sibilância. Os pacientes homocigotos para o alelo TT apresentaram tempo médio de internação e sibilância menor, quando comparados aos outros genótipos. No que se refere ao tempo de oxigenoterapia, houve redução de 47,34% do tempo de tratamento com oxigênio administrado, quando comparado aos pacientes heterocigotos e homocigotos CC.

A BVA é uma doença com perfil diverso de manifestações clínicas e com comprometimento pulmonar de intensidade variável. A falta de entendimento sobre os mecanismos responsáveis por essa doença, que possui alta prevalência na população pediátrica em todos os continentes, tem determinado uma incessante busca de respostas (2,3). A bronquiolite é uma área ativa de pesquisa, e muitos estudos importantes têm contribuído para o conhecimento dessa patologia nos últimos anos (2).

A apresentação das infecções pode variar significativamente e, em especial, a gravidade da BVA demonstra que podem existir diferentes fatores genéticos envolvidos na resposta de cada indivíduo. O presente estudo sugere que a variação rs2227543 está associada a uma proteção para BVA, revelando frequência significativamente maior do alelo homocigoto TT entre os pacientes controles. No entanto, não foi observado nenhum efeito significativo para o polimorfismo rs2227307.

Estudo prévio sugere que o polimorfismo rs4073 está associado com o aumento da produção de *IL-8*. Nesse estudo, a presença do alelo A do SNP rs4073 foi considerado como fator de risco para o desenvolvimento de bronquiolite grave. Esse trabalho, realizado em Oxford, fornece a primeira evidência de um determinante de suscetibilidade genética para a bronquiolite grave por VSR. Afirma-se que mais da metade da população do Reino Unido é heterocigota para o polimorfismo rs4073. Esse efeito foi mais pronunciado para a doença grave, requerendo terapia de oxigênio por mais de dois dias (10). Da mesma forma, o alelo T poderia ser considerado como fator de proteção. Esse alelo está em linkage disequilibrium com o alelo T do SNP rs2227543, o que reforça o achado desse estudo como replicação de resultados.

Heinzmann (15) desenvolveu um estudo com o objetivo de investigar o papel dos polimorfismos em *IL-8* (-T251A, C781T, C1633T, e A2767T), dentre eles o SNP rs4073 (-T251A), mostrado anteriormente. Essas variações foram genotipadas em quatro populações distintas: crianças com asma, crianças atópicas, crianças com artrite idiopática juvenil e uma população controle. Os resultados sugerem que a base genética da asma e da bronquiolite por VSR podem ser diferentes, para algumas variações genéticas, efeitos até mesmo opostos sobre o desenvolvimento de doenças foram encontrados. O mesmo alelo A do SNP rs4073, que traz suscetibilidade à bronquiolite por VSR, pode determinar proteção contra a asma.

Por outro lado, Puthothu (16) realizou uma pesquisa com o recrutamento de crianças com asma e doenças graves associadas ao VSR, em Freiburg, Alemanha. Foram genotipados cinco polimorfismos de *IL-8* (T-251A e C-781T) e *IL-8* RA (M31R, S276T e R335C). Nesse estudo, o polimorfismo T-251A e C-781T não mostrou associação com doenças graves associadas ao VSR, porém, especificamente em relação ao polimorfismo de *IL-8* C-781T, essa associação está presente quando se refere à asma.

Outro importante componente refere-se às características demográficas e étnicas, especialmente para africano-americanos e hispânicos. Um estudo realizado com seis hospitais do norte da Califórnia apresentou relação de dados associados com risco aumentado para a doença (6). Além disso, pacientes afro-americanos e hispânicos apresentam frequência menor do alelo T protetor, o que poderia, em parte, explicar o risco elevado nessas populações (dbSNP, NCBI).

Kresfelder destaca que a maioria dos estudos de associação genética e bronquiolite, causada por VSR, tem como alvo grupos de caucasianos, com pouco conhecimento de populações de países em desenvolvimento. A identificação de SNPs associados ao VSR em populações mistas pode ajudar a identificar os mecanismos gerais que são importantes para o desenvolvimento da doença grave nessas populações (17).

Podemos considerar que a principal limitação do presente estudo refere-se à falta de conhecimento das características étnicas da amostra que constitui os grupos caso e controle. Entretanto, a partir dos resultados deste estudo, pode-se ressaltar que, ao descobrir evidências de um polimorfismo genético ligado a uma doença, se abrem as portas para pesquisas com o objetivo de identificar marcadores que possuam ligações com a evolução da mesma. O conhecimento de polimorfismos genéticos pode ter grande

relevância clínica e pode direcionar as estratégias terapêuticas específicas para pacientes de alto risco para doença grave.

Os resultados deste estudo vêm somar-se aos dados disponíveis na literatura, na tentativa do entendimento da patogênese da BVA. A necessidade de pesquisa na área persiste, em busca de respostas que favoreçam progressos na conduta terapêutica dessa enfermidade, que constitui uma ameaça aos lactentes. Esse achado, em conjunto com a análise de estudos prévios, sugere que o polimorfismo de *IL-8*, rs2227543 está associado à proteção da BVA e influencia, diretamente, a gravidade da bronquiolite nessas crianças.

Referências Bibliográficas

1. Wainwright C. Acute viral bronchiolitis in children- a very common condition with few therapeutic options. *Paediatr Respir Rev* 2010; 11(1):39-45.
 2. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: recent evidence on diagnosis and management. *Pediatrics* 2010; 125(2):342-9.
 3. Mejías A, Chávez-Bueno S, Jafri HS, Ramilo O. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24(11 Suppl): S189-96.
 4. Mansbach JM. Us outpatient office visits for bronchiolitis, 1993-2004. *Ambul Pediatr* 2007; 7 (4): 304-7.
 5. Yorita KL. Infectious disease hospitalizations among infants in the United States. *Pediatrics* 2008; 121 (2): 244.
 6. Flaherman VJ, Ragins AI, Li SX, Kipnis P, Masaquel A, Escobar GJ: Frequency, duration and predictors of bronchiolitis episodes of care among infants ≥ 32 weeks gestation in a large integrated healthcare system: a retrospective cohort study. *BMC Health Services Research* 2012, 12:144.
 7. Pelletier AJ, Mansbach JM, Camargo CA. Direct medical costs of bronchiolitis hospitalizations in the United States. *Pediatrics* 2006, 118(6):2418-23.
 8. Stralioatto SM, Siqueira MM, Muler RL, et al. Viral etiology of acute respiratory infections among in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35:283-91.
 9. Geisler S, Lichtinghagen R, Böker KHW, Veh RW. Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinases family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. *Cell Tissue Res* 1997; 289:173-83.
 10. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000; 55:1023-7.
 11. Hattersley T.: What makes a good genetic association study? *Lancet* 2005, Vol 366; 1315-23.
 12. Pinto LA, Pitrez PM, Luisi F, de Mello PP, Gerhardt M, Ferlini R, Barbosa DC, Daros I, Jones MH, Stein RT, Marostica PJ: 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 Dec;161(6):1104-8
 13. The International HapMap Project. *Nature* 2003, 426(6968):789-96.
-

-
14. Pinto LA, Steudemann L, Depner M, Klopp N, Illig T, Weiland SK, von Mutius E, Kabesch M. STAT1 gene variations, IgE regulation and atopy. *Allergy* 2007, 62: 1456–61.
 15. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004 Sep;114(3):671-6.
 16. Puthothu B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A: Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clin Mol Allergy* 2006 Feb 17;4:2.
 17. Kresfelder TL, Janssen R, Bont L, Pretorius M, Venter M.: confirmation of an association between single nucleotide polymorphisms in the vdr gene with respiratory syncytial virus related disease in south african children. *Journal of Medical Virology* 2011 83:1834-40.
-

Tabelas/Figuras**Tabela 1.** Grupo em estudo versus controles, dados descritivos da amostra.

	BVA (N =115)	Controles (N =64)
Idade em meses, média ±DP	3,4 ±2,57	12,8±8,34
Sexo masculino, N (%)	65/115 (56,5)	24/60(40,0)
Peso de nascimento (Kg)	3,01±0,71	3,08±0,77
Peso atual (Kg)	5,70±2,05	8,08±4,10

BVA: bronquiolite viral aguda

Tabela 2. Resultados da genotipagem, frequência alélica e desvio do equilíbrio de Hardy Weinberg para os SNPs rs2227307 e rs2227543.

rs2227307	Observado	Esperado
Homozigoto freqüente	73	72,4
Heterozigoto	78	82,3
Homozigoto raro	22	23,4
Var freq alelo		0,36
Valor de P		0,838
rs2227543		
Homozigoto freqüente	83	81,6
Heterozigoto	68	77,9
Homozigoto raro	22	18,6
Var freq alelo		0,32
Valor de P		0,240

SNP: *single nucleotide polymorphism*

Tabela 3. Resultado da genotipagem em ambos os grupos.

		CASOS	CONTROLES	P
rs2227307	GG	14	8	0,782
		12,1%	13,3%	
	GT	55	23	
		47,4%	38,3%	
	TT	46	27	
		39,7%	43,5%	
rs2227543	CC	69	14	<0,001
		59,5%	23,3%	
	CT	38	30	
		33%	50%	
	TT	8	14	
		6,9%	22,6%	

Tabela 4. Associação de variáveis clínicas do grupo casos e a ocorrência de homozigoto TT no SNP 2- rs2227543.

	<i>IL-8</i> SNP2	N	Média	DP	P
Total dias internado	CC/CT	107	8,63	15,750	
	TT	8	5,25	2,550	,061
Total dias de uso de O2	CC/CT	107	8,07	15,851	
	TT	8	4,25	1,753	,023
Total dias sibilância	CC/CT	107	6,68	15,984	
	TT	8	3,75	3,105	,128

SNP: *single nucleotide polymorphism*

CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSÕES

Até o momento, poucos estudos têm investigado o impacto de polimorfismos genéticos nas doenças respiratórias graves.

A partir dos resultados do presente estudo, concluímos que esse achado, em conjunto com a análise de estudos prévios, sugere que o polimorfismo de *IL-8*, rs2227543 está associado à proteção da BVA e influenza, diretamente, a ocorrência e a gravidade da bronquiolite nessa população.

É importante salientar que este pode ser um primeiro passo no entendimento dos mecanismos pelos quais existe uma variabilidade tão importante na gravidade da bronquiolite viral. O SNP rs2227543 e o papel da *IL-8* na BVA merecem mais estudos de replicação e mecanística.

Por outro lado, quando nos referimos ao SNP rs2227307, observamos que esse SNP não apresentou associações estatisticamente significativas.
