

UNICAMP



# **INFLUÊNCIA GENÉTICA NA BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA GRAVE**

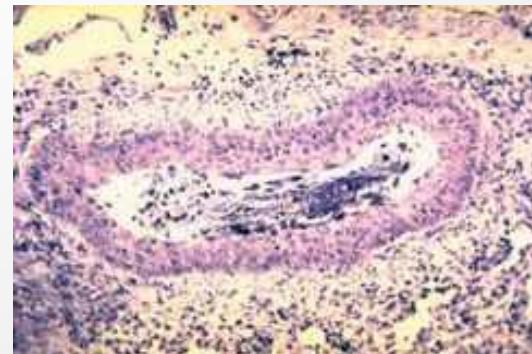
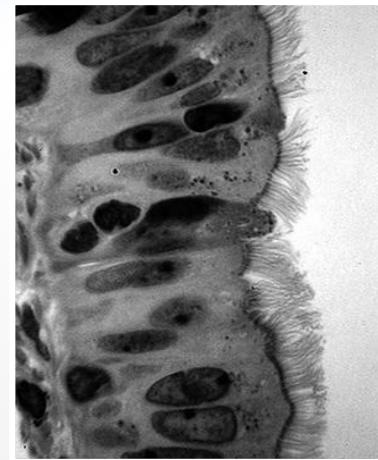
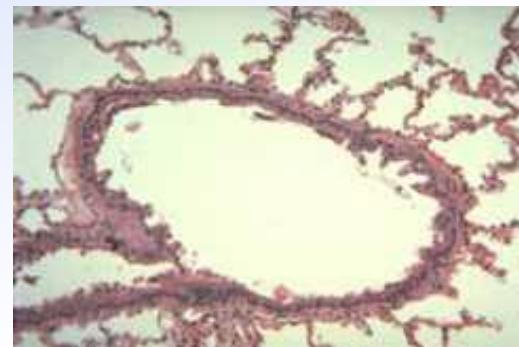
**ALFONSO EDUARDO ALVAREZ**

**CAFÉ DA MANHÃ CIENTÍFICO  
9 de Agosto de 2016**

# **INTRODUÇÃO**

# BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA

- **Principal infecção das vias aéreas inferiores em crianças menores de 2 anos de idade no mundo**
- **Principal causa de internação nessa faixa etária em países desenvolvidos**

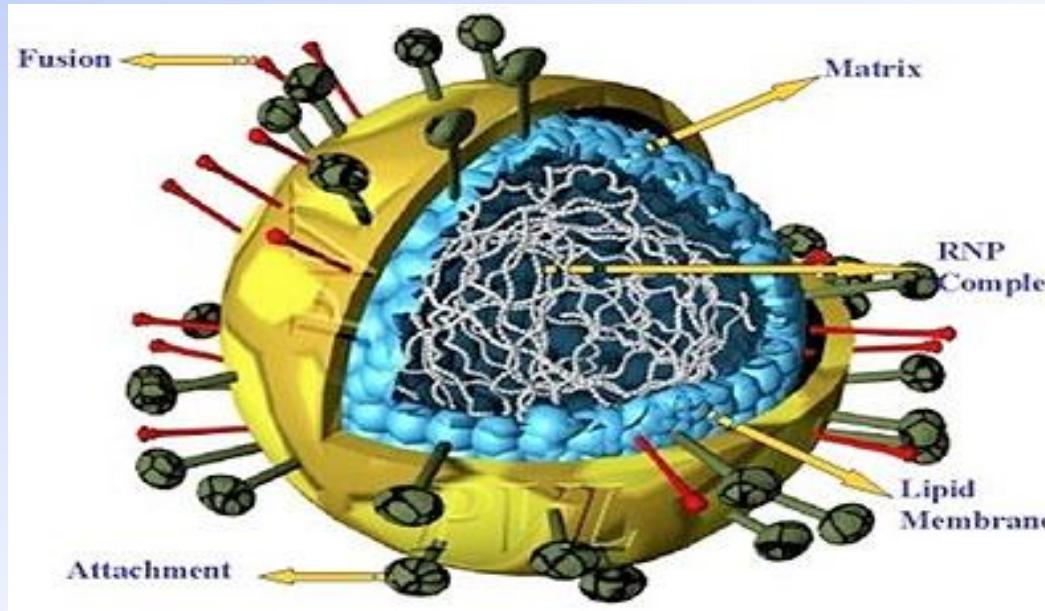


# **BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA**

- **100.000 internações por ano nos Estados Unidos**
- **Custo de U\$ 1,73 bilhão**
- **66.000 a 199.000 mortes por ano no mundo**



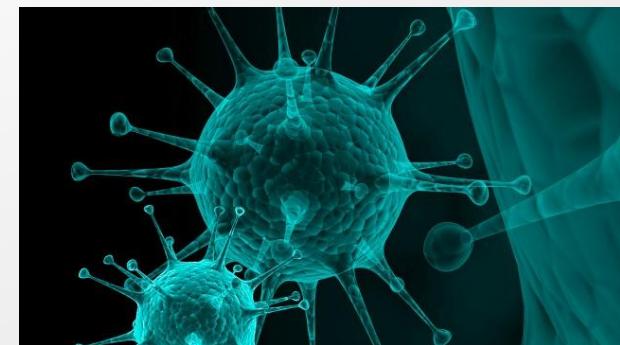
# VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO



- **70% das bronquiolites são causadas pelo VSR**
- **Praticamente 100% das crianças são infectadas pelo VSR até os 2 anos de idade**

# OUTROS VÍRUS

- **Rinovírus: 18 a 40%**
- **Adenovírus**
- **Bocavírus**
- **Influenza A e B**
- **Parainfluenza 1, 2 e 3**
- **Metapneumovírus**
- **Coronavírus**
- **Enterovírus**



# **GRANDE VARIABILIDADE NA APRESENTAÇÃO CLÍNICA**

- **Sintomas leves de infecção em vias aéreas superiores**
- **Bronquiolite**
- **Pneumonia**
- **Internação em UTI**
- **Ventilação mecânica**
- **Óbito**



# **FATORES DE RISCO**

# Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus<sup>☆</sup>

Alfonso Eduardo Alvarez<sup>a</sup>, Fernando Augusto de Lima Marson<sup>a,\*</sup>,  
Carmen Sílvia Bertuzzo<sup>b</sup>, Clarice Weis Arns<sup>c</sup>, José Dirceu Ribeiro<sup>a</sup>



**PREMATURIDADE**



**TABAGISMO PASSIVO**

# Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus<sup>☆</sup>

Alfonso Eduardo Alvarez<sup>a</sup>, Fernando Augusto de Lima Marson<sup>a,\*</sup>,  
Carmen Sílvia Bertuzzo<sup>b</sup>, Clarice Weis Arns<sup>c</sup>, José Dirceu Ribeiro<sup>a</sup>



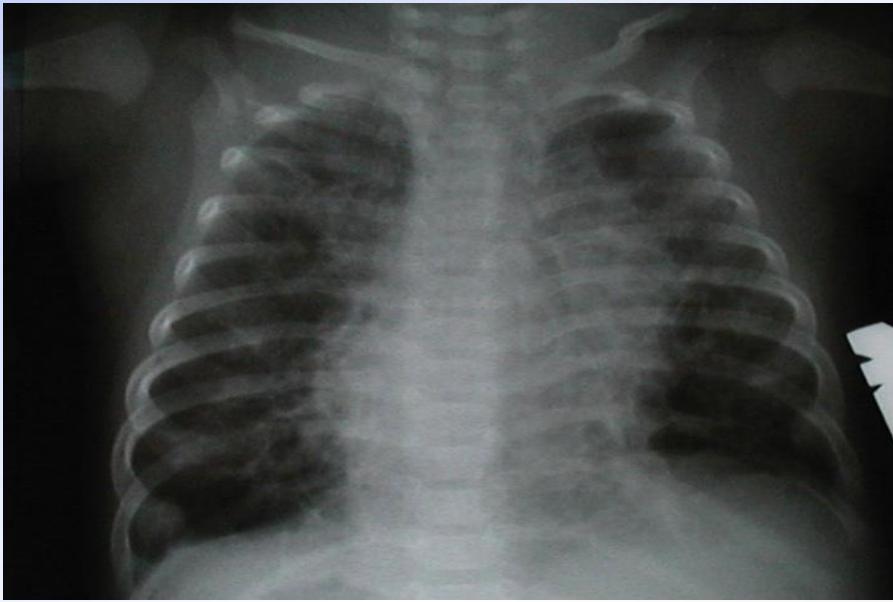
**BAIXA IDADE**



**AUSÊNCIA DE ALEITAMENTO MATERNO**

# Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus<sup>☆</sup>

Alfonso Eduardo Alvarez<sup>a</sup>, Fernando Augusto de Lima Marson<sup>a,\*</sup>,  
Carmen Sílvia Bertuzzo<sup>b</sup>, Clarice Weis Arns<sup>c</sup>, José Dirceu Ribeiro<sup>a</sup>



**PNEUMOPATIA CRÔNICA**

**CARDIOPATIA CONGÊNITA**

**A MAIORIA DOS  
LACTENTES  
INTERNADOS POR  
BRONQUIOLITE  
NÃO APRESENTA  
NENHUM FATOR  
DE RISCO!!!**



**SERÁ QUE FATORES  
GENÉTICOS  
PODERIAM  
EXPLICAR A  
VARIABILIDADE DA  
APRESENTAÇÃO  
CLÍNICA?**



# **Increased Concordance of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection in Identical Twins**

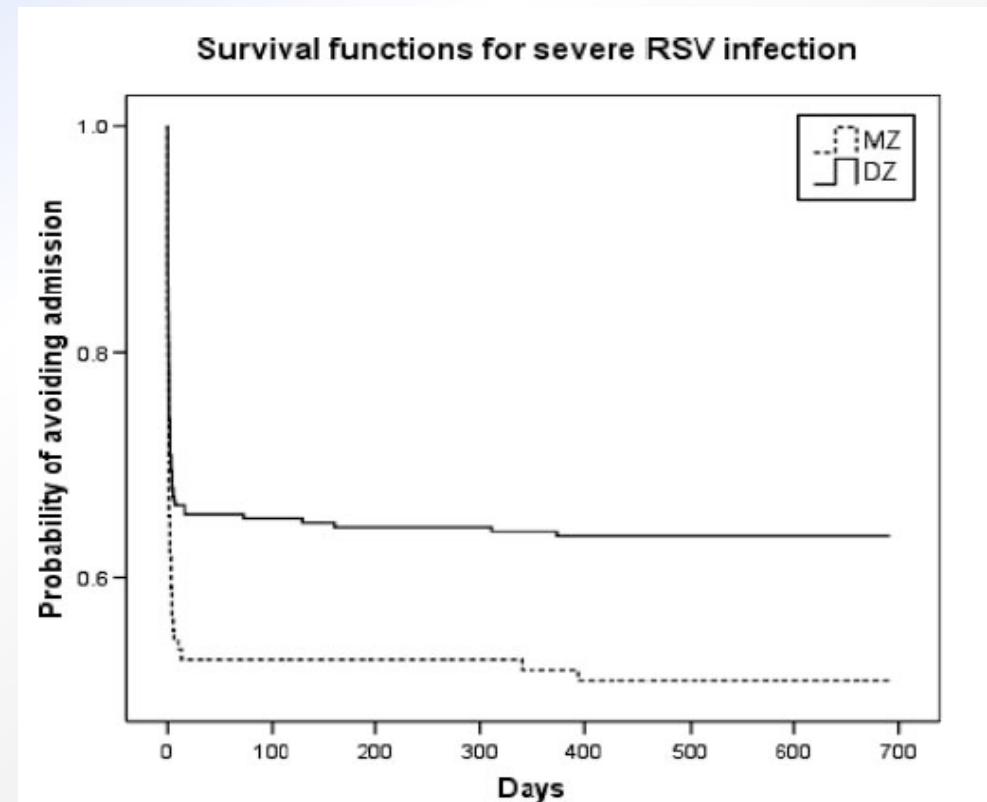
**PEDIATRICS**  
OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS

**12346 pares de gêmeos**

**Concordância entre os gêmeos em relação a hospitalização por VSR**

**Concordância: 0,66 nos gêmeos homozigóticos e 0,53 nos gêmeos dizigóticos**

**Contribuição genética de 16 a 20% para a gravidade da doença**



Thomsen SF - Pediatrics 2008

## **RECONHECIMENTO DO VSR**

- **O VSR é reconhecido pelos Receptores Toll-Like**
- **O principal é o Toll-Like Receptor 4**
- **Outros receptores Toll-Like associados ao reconhecimento do VSR são o 2, 9 e 10**
- **Estudos tem avaliado se a presença de Polimorfismos nos genes desses receptores poderiam estar associados a presença e gravidade da bronquiolite**

# **OUTROS GENES DA RESPOSTA IMUNE ESTUDADOS**

- **Regulated on Activation Normal T cell  
Expressed and Secreted (RANTES)**
- **Vitamin D Receptor (VDR)**
- **Inducible Nitric Oxide Synthase (NOS2)**
- **Interferon (IFNA5)**
- **JUN**

# **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO PRINCIPAL**

- **Avaliar as características genéticas associadas à prevalência e à gravidade da BVA.**

## **OBJETIVOS SEGUNDÁRIOS**

- **Avaliar as características epidemiológicas associadas à gravidade da BVA.**
- **Avaliar as características etiológicas associadas à gravidade da BVA.**

# MÉTODOS

# PACIENTES

- **Avaliação prospectiva de todos os pacientes menores de 2 anos internados por BVA. Foram excluídos pacientes com sibilância anterior.**
- **2013 e 2014**
- **3 Hospitais**



# PACIENTES

➤ **Questionário para História Clínica  
e variáveis epidemiológicas**



➤ **Aspirado Nasofaríngeo para  
identificação dos Vírus**



➤ **Coleta de Sangue para análise dos  
Polimorfismos**

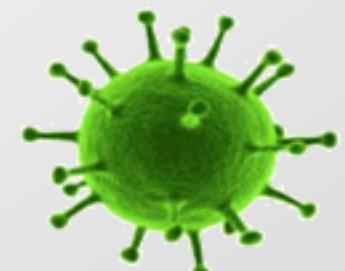
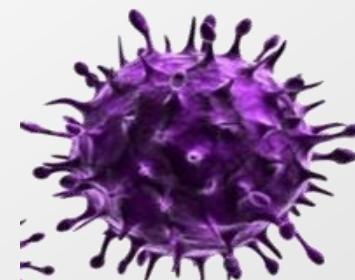
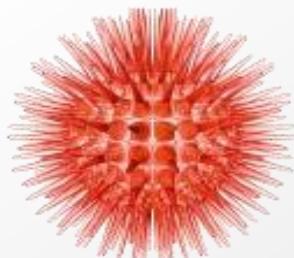
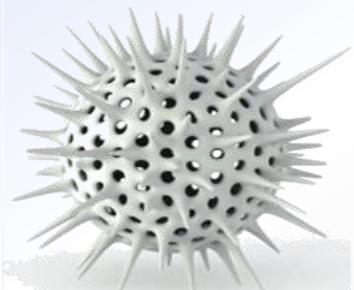


➤ **Acompanhamento prospectivo da  
internação até a alta**

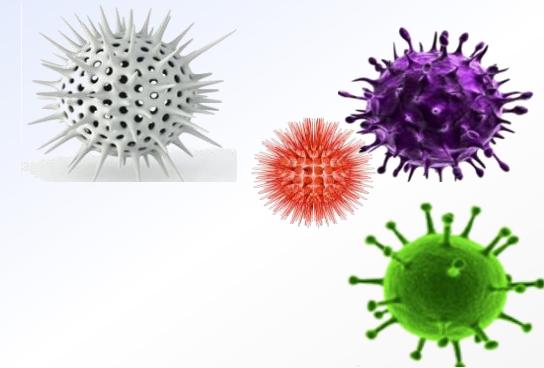


# **IDENTIFICAÇÃO VIRAL**

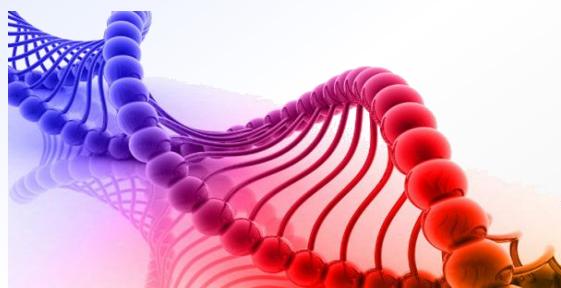
**INSTITUTO DE BIOLOGIA  
SETOR DE VIROLOGIA**



# PCR e eletroforese



- Kit utilizado: RV 15 Ace Detection - Seeplex®
- Teste qualitativo *in vitro*
- Eletroforese: gel de agarose a 2 %

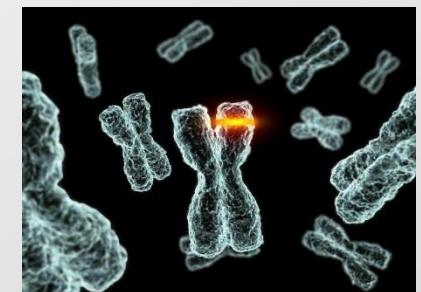


# **VÍRUS PESQUISADOS**

- 1. VSR tipo A**
- 2. VSR tipo B**
- 3. Rhinovírus A/B/C**
- 4. Parainfluenza tipo 1**
- 5. Parainfluenza tipo 2**
- 6. Parainfluenza tipo 3**
- 7. Parainfluenza tipo 4**
- 8. Adenovírus**
- 9. Coronavírus 229E/NL63**
- 10. Coronavírus OC43**
- 11. Influenza tipo A**
- 12. Influenza tipo B**
- 13. Bocavírus 1/2/3/4**
- 14. Metapneumovírus**
- 15. Enterovírus**

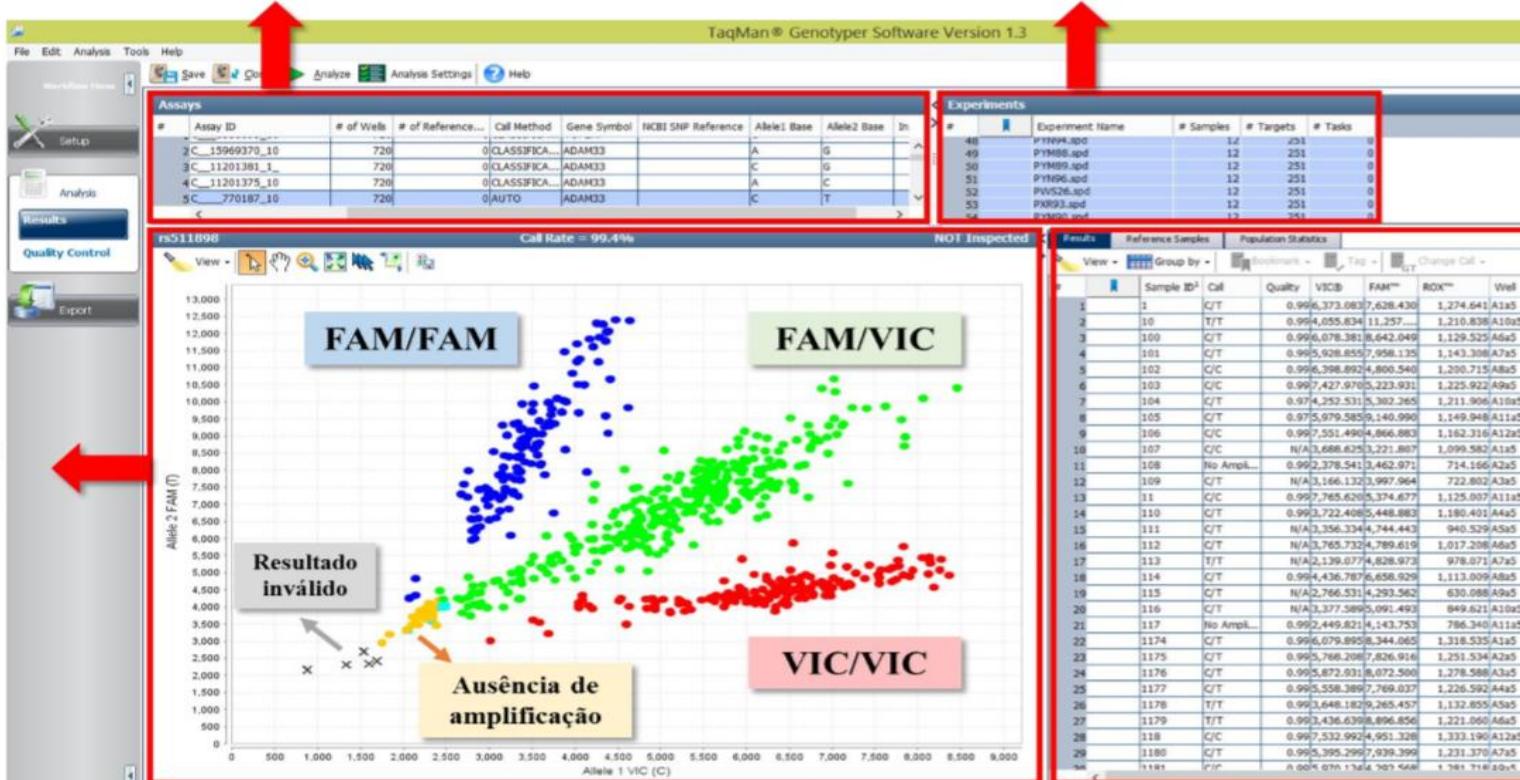
# IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA**



# Análise Genética - OpenArray™ (LifeTechnologies®)

## Dados dos polimorfismos analisados



Visualização  
dos dados por  
fluorescência

## Lâminas analisadas

Listagem de  
amostras por  
polimorfismos

# **POLIMORFISMOS ANALISADOS**

- 1. rs4986790 (TLR4)**
- 2. rs4986791 (TLR4)**
- 3. rs1927911 (TLR4)**
- 4. rs898830 (TLR2)**
- 5. rs7656411 (TLR2)**
- 6. rs352162 (TLR9)**
- 7. rs187084 (TLR9)**
- 8. rs1065341 (RANTES)**
- 9. rs2107538 (RANTES)**
- 10. rs2280788 (RANTES)**
- 11. rs2280789 (RANTES)**
- 12. rs10735810 (VDR)**
- 13. rs2228570 (VDR)**
- 14. rs1060826 (NOS2)**
- 15. rs10757212 (IFNA5)**
- 16. rs11688 (JUN)**

# **DESFECHOS AVALIADOS**

- **Tempo de internação**
- **Tempo de utilização de Oxigênio**
- **Necessidade e tempo de internação em UTI**
- **Necessidade e tempo de ventilação mecânica**
- **Evolução à óbito**



## **GRUPO CONTROLE**

**536 pessoas entre 18 e 25 anos de idade  
sem história pessoal ou familiar de doença  
respiratória por 2 gerações.**

# ANÁLISE ESTATÍSTICA

- Os dados epidemiológicos e laboratoriais foram descritos por frequência (porcentagem) para variáveis categóricas, e médias  $\pm$  desvio padrão ou mediana (mínimo e máximo) para dados numéricos.
- Os dados epidemiológicos, o tipo de vírus, a presença de polimorfismos e os desfechos foram comparados entre os pacientes.
- A frequência dos polimorfismos foi comparado entre os pacientes e os controles.
- Foram também analisadas as frequências dos polimorfismo em pacientes e controles para cada tipo de vírus (VSR, VSR subtipo A, VSR subtipo B, rinovírus, e codetecção viral).



# ANÁLISE ESTATÍSTICA

- Uma segunda análise foi realizada apenas com os pacientes sem comorbidades (prematuridade, doença respiratória crônica e doença cardíaca congênita) para todas as comparações citadas anteriormente.
- O teste exato de Fisher e o teste  $\chi^2$  foram aplicados para comparar os dados categóricos.
- Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram usados para comparar os dados numéricos.
- Foram relatados odds ratio e intervalos de confiança de 95%.
- P <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.
- Os dados foram analisados usando o software SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

# ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

**CAAE: 00869612.7.0000.5404**



**Os pais ou responsáveis pelos pacientes receberam a explicação detalhada sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento**

# **RESULTADOS**

# ÍNCLUIDOS 181 LACTENTES (176 < 1 ANO)

## CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

<b>Masculino</b>	<b>105 (58%)</b>
<b>Peso ao nascimento</b>	<b>3102 (565-4850)</b>
<b>Caucasóide</b>	<b>130 (73,9%)</b>
<b>Idade gestacional</b>	<b>38 (28-42)</b>
<b>Prematuridade (&lt; 37)</b>	<b>38 (21%)</b>
<b>Idade (dias)</b>	<b>104 (14-622)</b>
<b>LM exclusivo</b>	<b>64 (36,6%)</b>
<b>Doença respiratória crônica</b>	<b>3 (1,7%)</b>
<b>Cardiopatia congênita</b>	<b>13 (7,3%)</b>

## CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

<b>Tabagismo gestacional</b>	<b>18 (10,2%)</b>
<b>Tabagismo passivo</b>	<b>50 (28,4%)</b>
<b>Número de irmãos</b>	<b>1 (0-7)</b>
<b>Número de pessoas na casa</b>	<b>4 (2-13)</b>
<b>Frequência à creche</b>	<b>25 (14,1%)</b>



# ANTECEDENTE FAMILIAR DE ATOPIA

	<b>Asma</b>	<b>Rinite Alérgica</b>	<b>Dermatite Atópica</b>
<b>Mãe</b>	<b>12,4%</b>	<b>25,6%</b>	<b>4,5%</b>
<b>Pai</b>	<b>11,9%</b>	<b>15,3%</b>	<b>1,7%</b>
<b>Irmãos</b>	<b>21,5%</b>	<b>18,6%</b>	<b>9,6%</b>



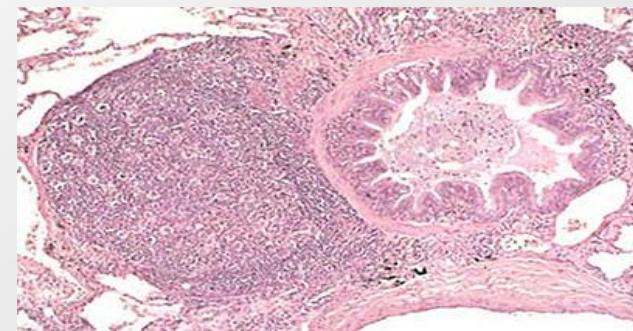
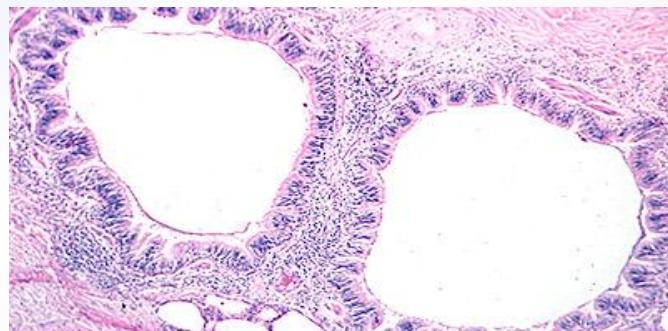
# **ESCOLARIDADE MATERNA**

<b>Ensino Fundamental</b>	<b>83 (48%)</b>
<b>Ensino Médio</b>	<b>62 (35,8%)</b>
<b>Graduação / Pós-Graduação</b>	<b>28 (16,2%)</b>



# EVOLUÇÃO

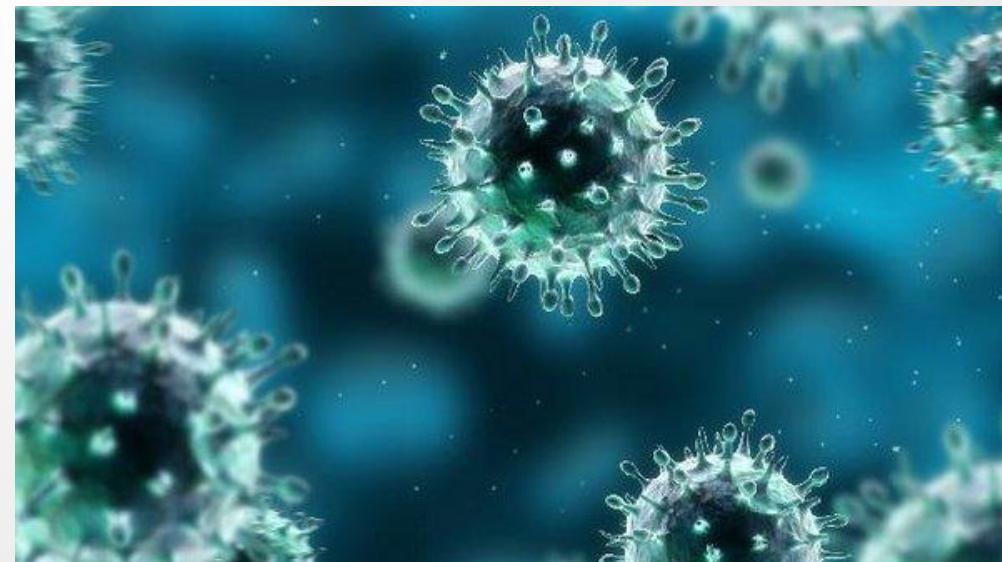
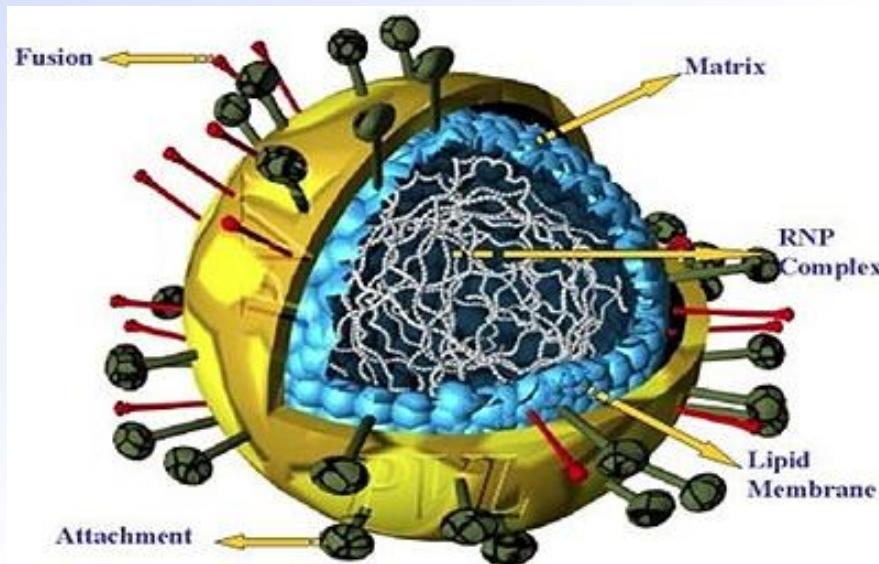
<b>Tempo de Internação</b>	<b>1 a 64 dias (mediana 6,5 dias)</b>
<b>Tempo de Oxigenoterapia</b>	<b>1 a 63 dias (mediana 5 dias)</b>
<b>Internação em UTI</b>	<b>34%</b>
<b>Tempo de Internação em UTI</b>	<b>2 a 37 dias (mediana 9 dias)</b>
<b>Ventilação Mecânica</b>	<b>21%</b>
<b>Tempo de Ventilação Mecânica</b>	<b>2 a 37 dias (mediana 8,5 dias)</b>
<b>Evolução à óbito</b>	<b>5 pacientes (2,8%)</b>



# 173 PACIENTES COLATERAM ASPIRADO NASOFARÍNGEO IDENTIFICAÇÃO VIRAL OCORREU EM 87,3%

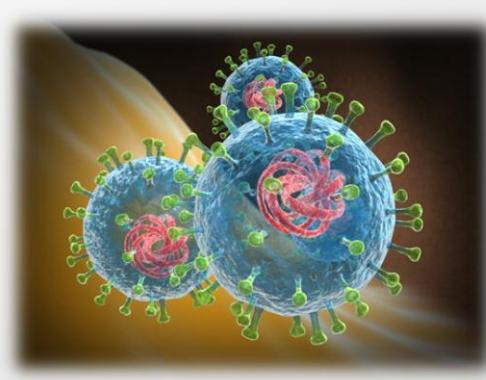
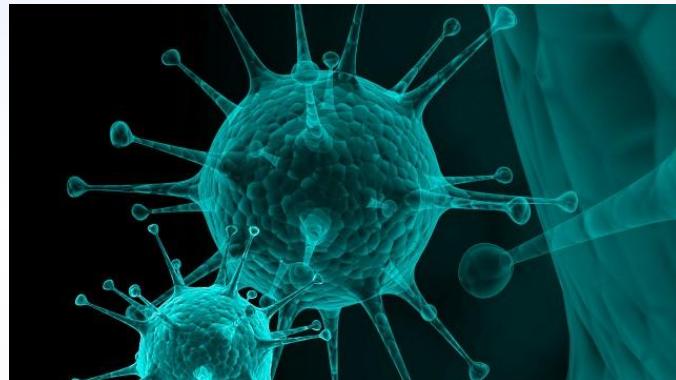
## IDENTIFICAÇÃO VIRAL

<b>Vírus Sincicial Respiratório</b>	<b>121 (69,9%)</b>
<b>Vírus Sincicial Respiratório - A</b>	<b>91 (52,6%)</b>
<b>Vírus Sincicial Respiratório - B</b>	<b>31 (17,9%)</b>
<b>Rinovírus</b>	<b>46 (26,6%)</b>



# IDENTIFICAÇÃO VIRAL

<b>Parainfluenza</b>	<b>6 (3,5%)</b>
<b>Adenovírus</b>	<b>8 (4,6%)</b>
<b>Coronavírus</b>	<b>3 (1,7%)</b>
<b>Influenza</b>	<b>2 (1,2%)</b>
<b>Bocavírus</b>	<b>1 (0,6%)</b>
<b>Metapneumovírus</b>	<b>3 (1,7%)</b>
<b>Enterovírus</b>	<b>2 (1,2%)</b>
<b>Negativo</b>	<b>22 (12,7%)</b>
<b>Codetecção</b>	<b>37 (21,4%)</b>



# **ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E PRESENÇA DE BRONQUIOLITE**

**rs2107538 (RANTES):  
bronquiolite causada por VSR**

**rs2107538 (RANTES):  
bronquiolite causada por VSR-A**

**rs106826 (NOS2):  
bronquiolite causada por Rinovírus**

# ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE

## EVOLUÇÃO À ÓBITO

- **rs4986790 (TLR4)**
- **rs898830 (TLR2)**
- **rs2228570 (VDR)**

# ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE

## **NECESSIDADE DE UTI**

- **rs352162 (TLR9)**
- **rs187084 (TLR9)**
- **rs2280788 (RANTES)**

# ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE

## NECESSIDADE DE VENTILAÇÃO MECÂNICA

- **rs1927911 (TL4)**
- **rs352162 (TLR9)**
- **rs2107538 (RANTES)**

# ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE

## **TEMPO DE OXIGENOTERAPIA**

- rs7656411 (TLR2)

# **ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE**

**Pior evolução associada à:**

- **Mãe com atopia**
- **Pai com atopia**
- **Irmãos com atopia**
- **Baixa escolaridade materna**
- **Maior número de irmãos**
- **Maior número de pessoas na casa**

# **ASSOCIAÇÃO ENTRE VÍRUS E GRAVIDADE DA BRONQUIOLITE**

**Pacientes com VSR-B tiveram menor  
tempo de internação e de  
oxigenoterapia.**

# **DISCUSSÃO**

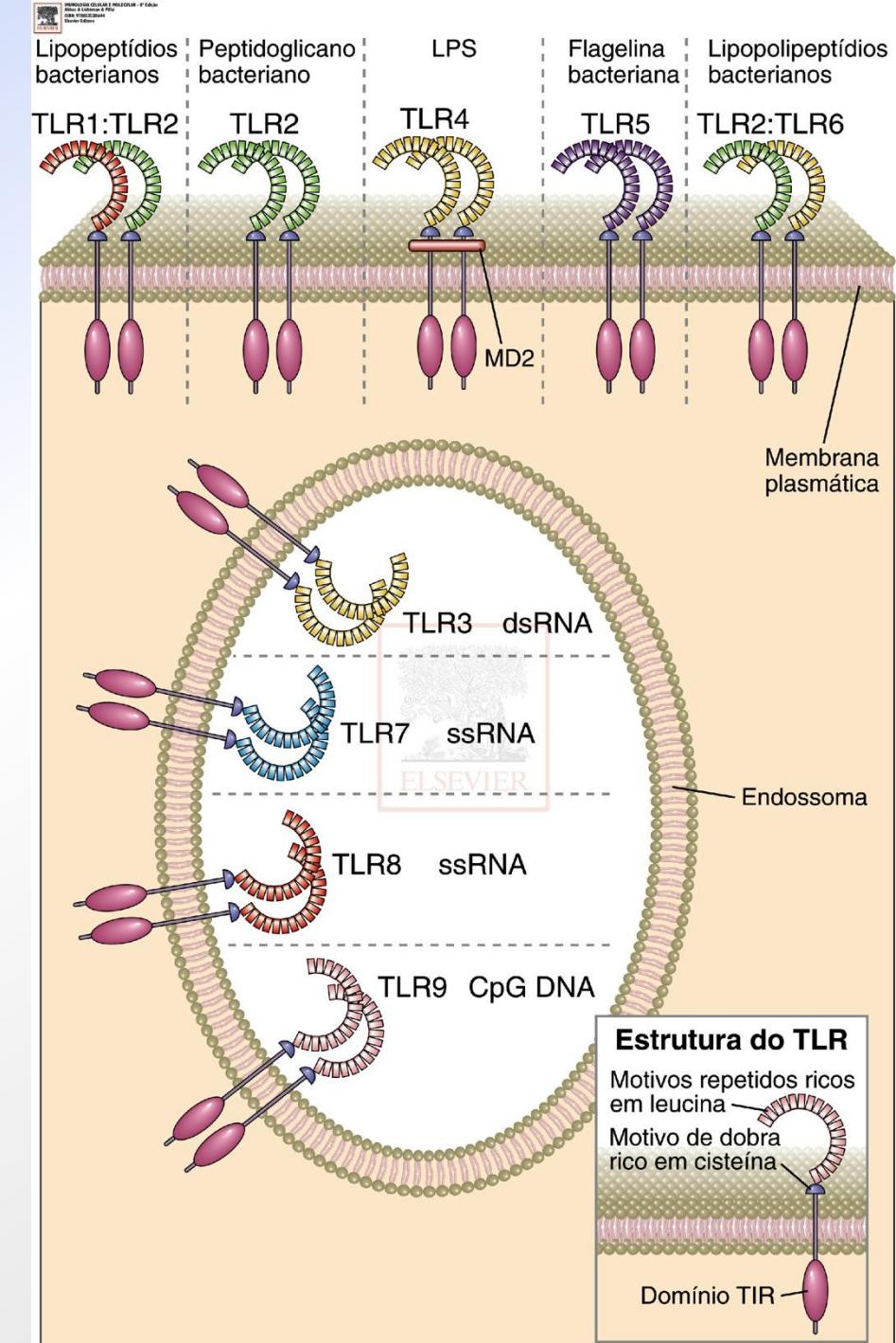
# RECEPTORES DO TIPO TOLL (TOOL LIKE RECEPTORS)

Receptor de Reconhecimento de Padrões

Pelo menos 10 tipos diferentes

Presente em Macrófagos e Células Dendríticas

Ligaçāo entre o estímulo produzido por microorganismos e o início da resposta imune



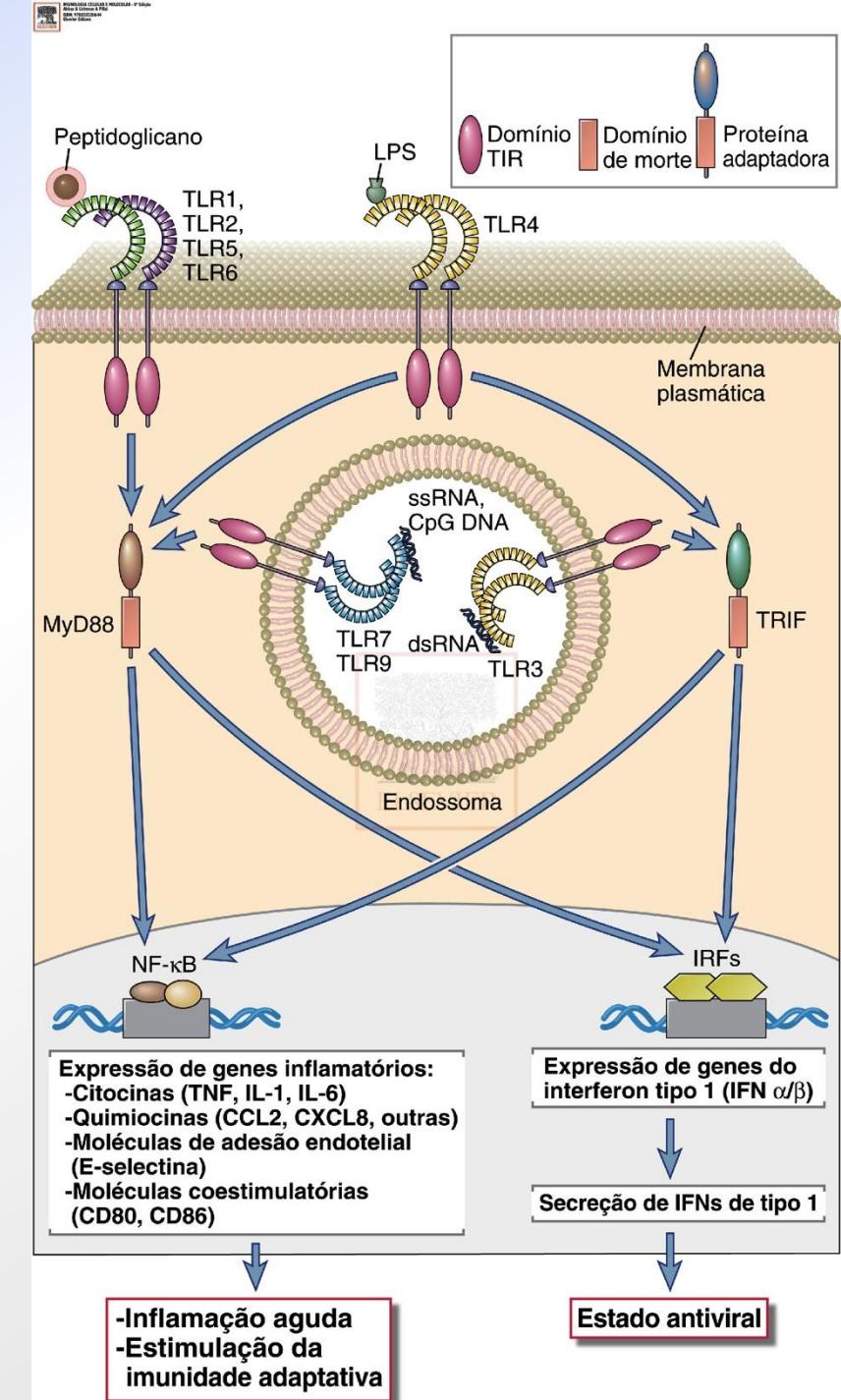
# TOLL LIKE RECEPTOR 4

## INTERAÇÃO ENTRE O TLR4 E VSR

- ✓ Expressão de genes inflamatórios:
- Citocinas - Interleucinas 6, 8, 10 e 13
- Fator de Necrose Tumoral
- Quimiocinas: RANTES, CCL2, CXCL8
- Moléculas de adesão endotelial
- Moléculas coestimulatórias
- ✓ Expressão de genes do Interferon 1

**INFLAMAÇÃO AGUDA**

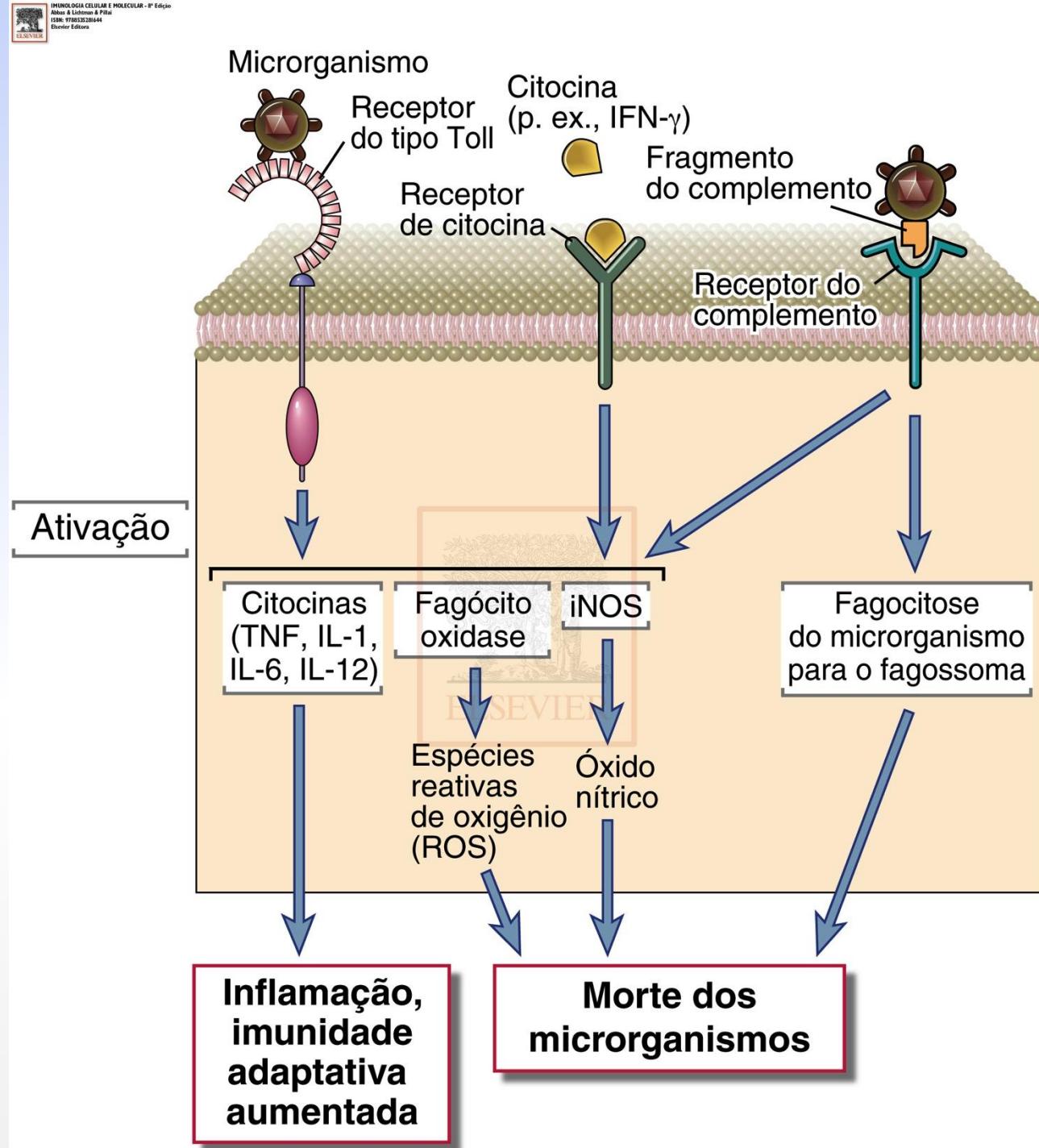
**ESTIMULAÇÃO DA IMUNIDADE  
ADAPTATIVA**



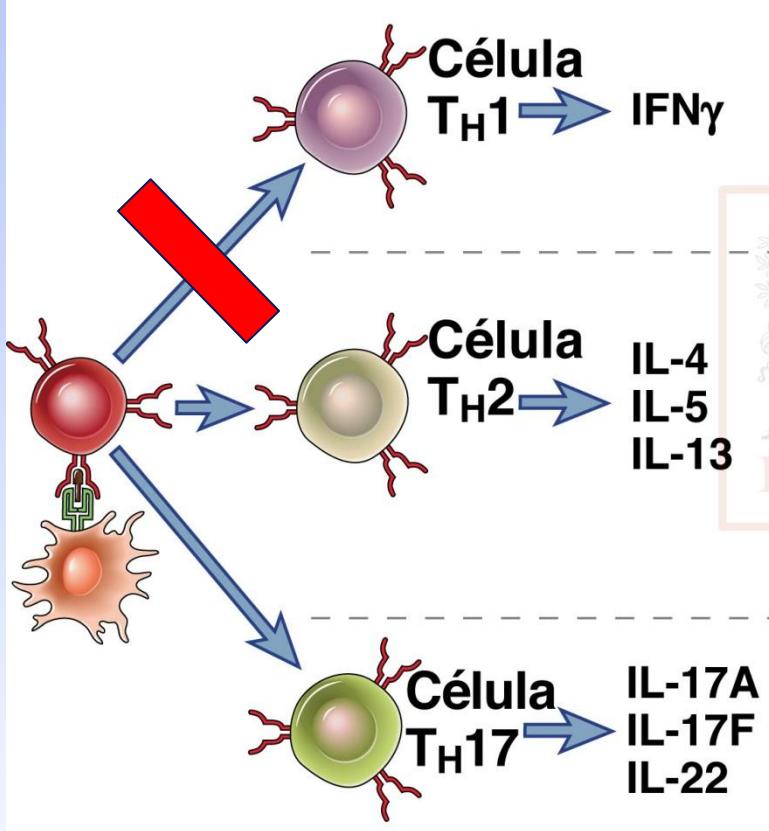
# RESPOSTA IMUNE

- ✓ **Propriedades antivirais diretas**
- ✓ **Estimulação de:**
  - Células Natural Killer
  - Granulócitos
  - Monócitos
  - Macrófagos

## INÍCIO DA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA



Principais citocinas	Reações imunológicas	Defesa do hospedeiro	Papel nas doenças
Célula T <sub>H</sub> 1 → IFN $\gamma$	Ativação de macrófagos; produção de IgG	Microrganismos intracelulares	Doenças autoimunes; dano tecidual associado às infecções crônicas
Célula T <sub>H</sub> 2 → IL-4 IL-5 IL-13	Ativação de mastócitos, eosinófilos; produção de IgE; ativação “alternativa” de macrófagos	Parasitas helmintos	Doenças alérgicas
Célula T <sub>H</sub> 17 → IL-17A IL-17F IL-22	Inflamação neutrofílica, monocítica	Bactérias extracelulares, fungos	Doenças inflamatórias autoimunes



**Host response to respiratory syncytial virus infection**

**Immunity to RSV in early-life**

Arruvito L – Curr Opin Infect Dis 2015

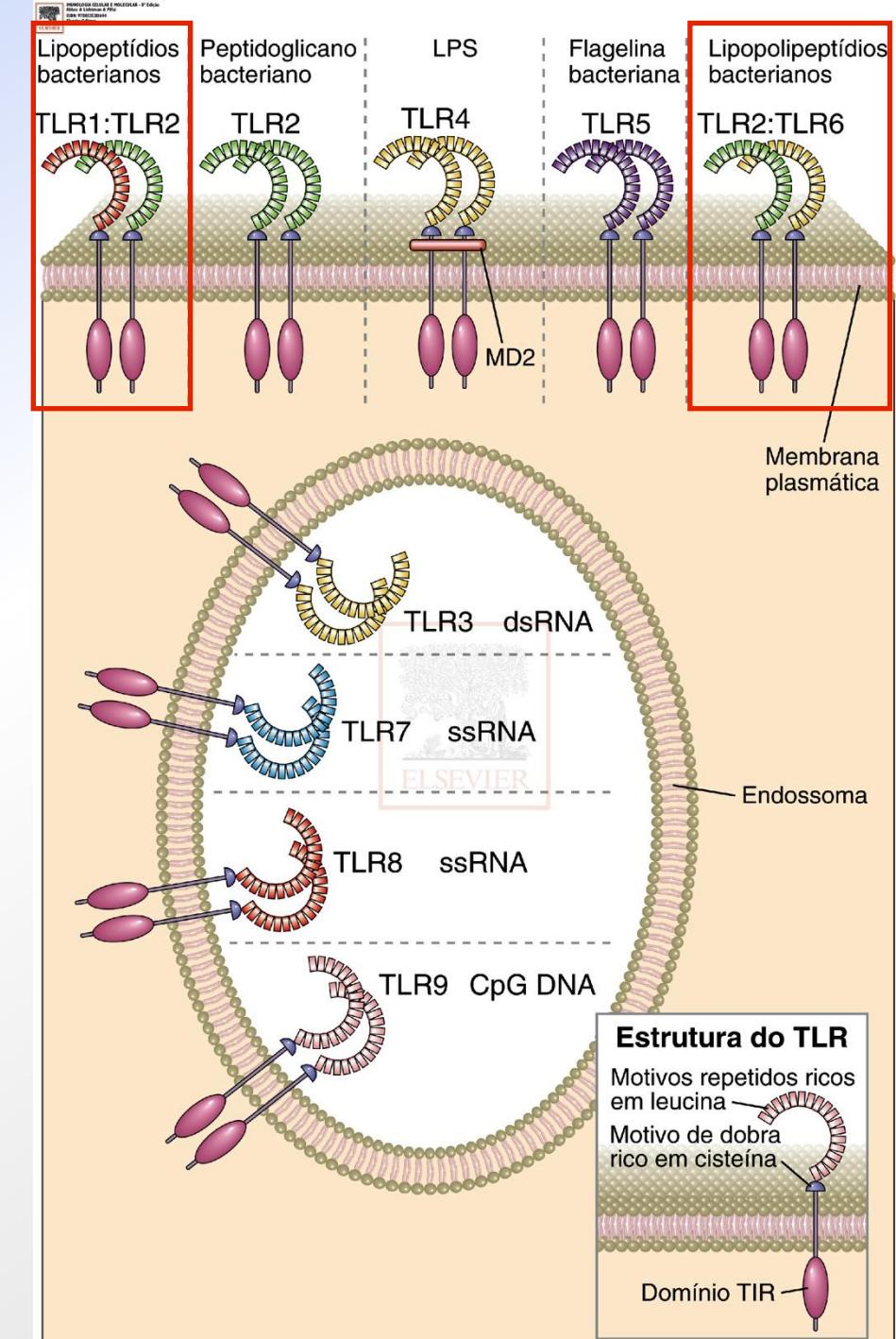
Lambert L - Front Immunol 2014

**Nosso estudo demonstrou associação entre rs4986790 (TLR4) e evolução à óbito e entre rs1927911 (TL4) e necessidade de ventilacão mecânica.**

# TOLL LIKE RECEPTOR 2

Expresso na superfície  
das células imunes  
como um complexo:

- com TLR1
- ou
- com TLR6



# TOLL LIKE RECEPTOR 2

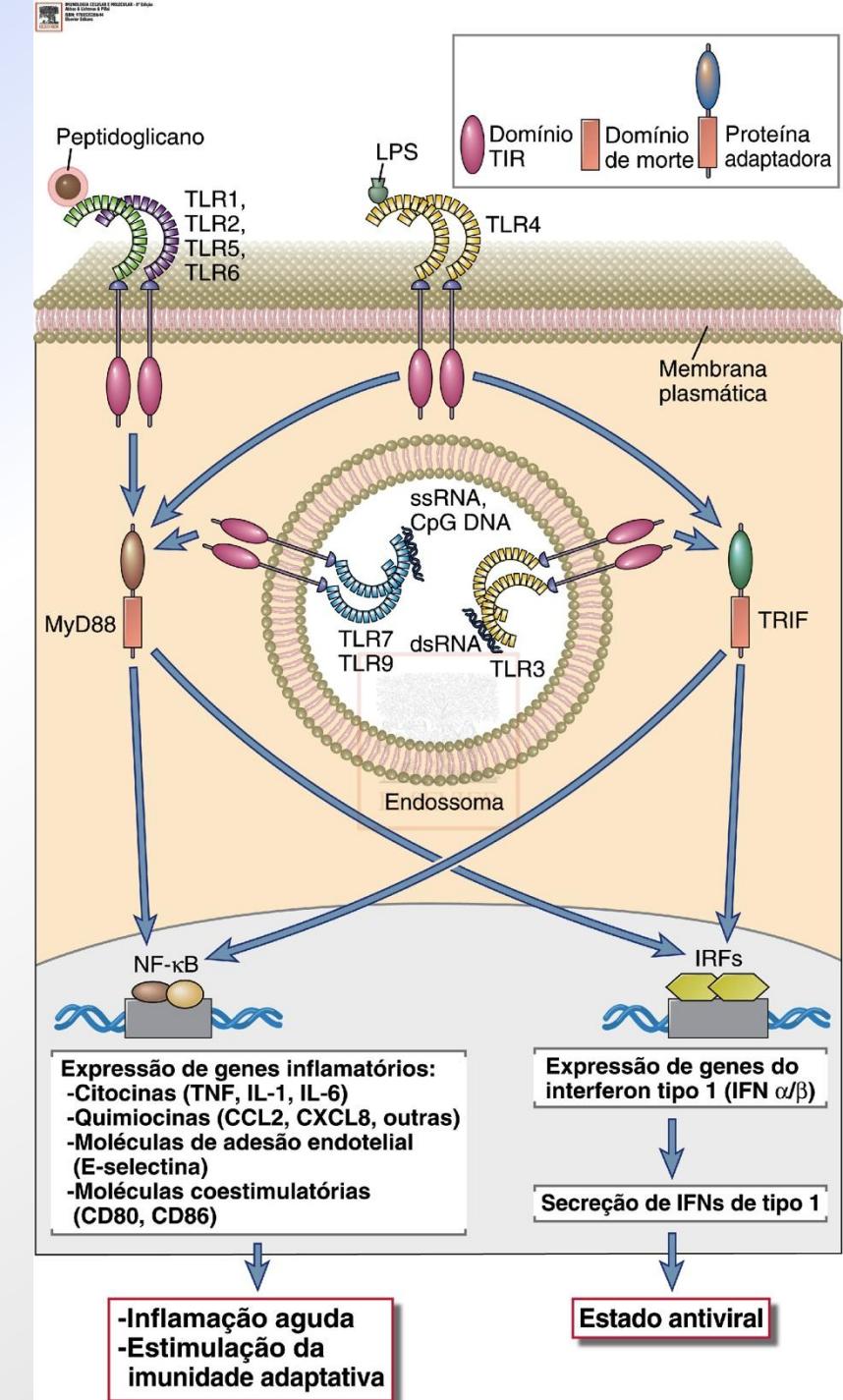
## INTERAÇÃO ENTRE O TLR2 E VSR

- ✓ Expressão de genes inflamatórios:
- Citocinas - Interleucinas 6
- Fator de Necrose Tumoral Alfa
- Quimiocinas: RANTES, CCL2
  
- ✓ Migração de Neutrófilos
- ✓ Ativação de Células Dendríticas

**INFLAMAÇÃO AGUDA**

**ESTIMULAÇÃO DA IMUNIDADE**

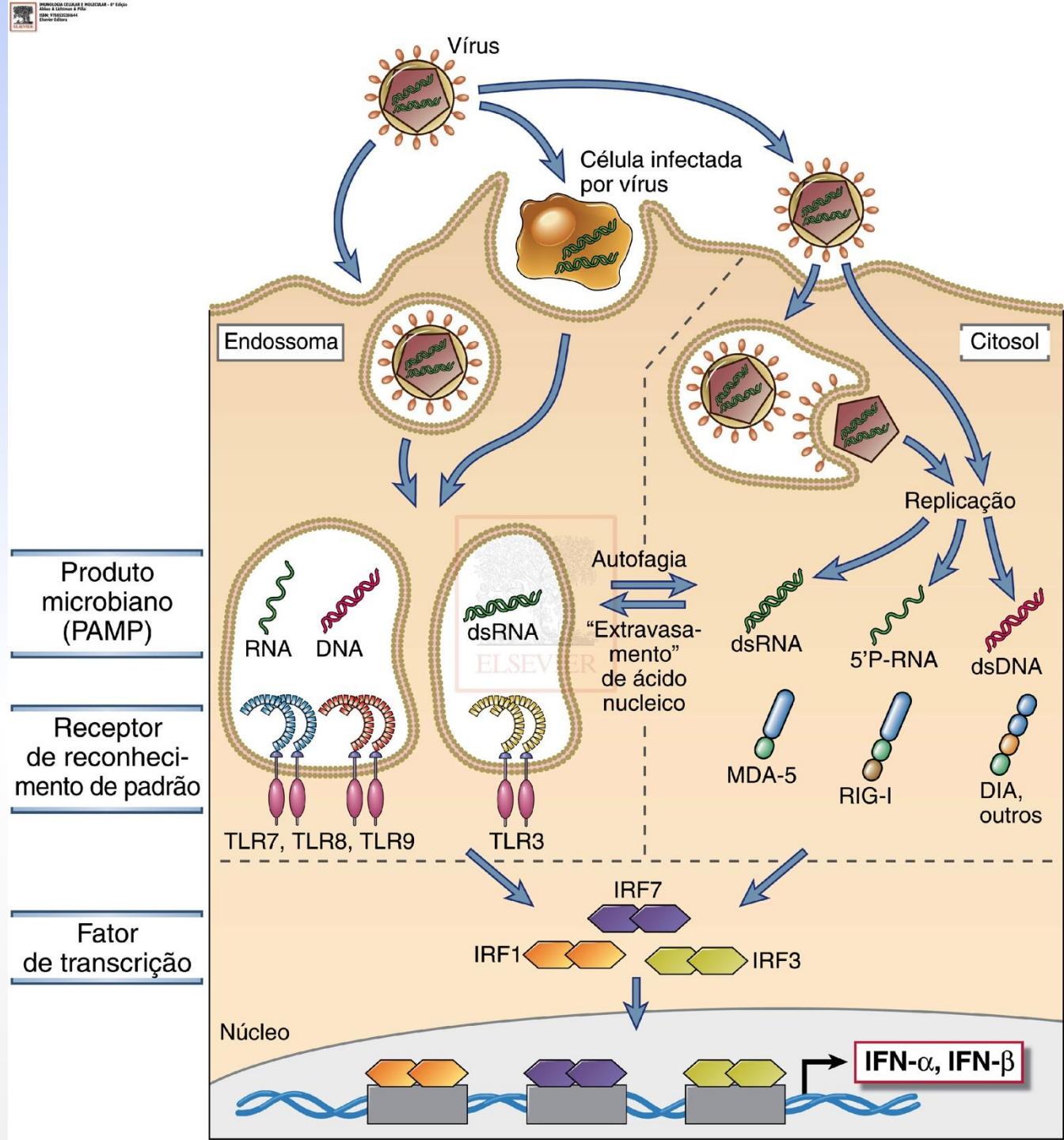
**ADAPTATIVA**



**Nosso estudo demonstrou associação entre rs898830 (TLR2) e evolução à óbito e entre rs7656411 (TLR2) e tempo de oxigenoterapia.**

# TOLL LIKE RECEPTOR 9

- Localizado na membrana endossomal
- Ativa a produção de Interferon
- VSR inibe a produção de interferon via TLR9
- ↑ resposta TH2



**Nosso estudo demonstrou associação entre rs352162 (TLR9) e rs187084 (TLR9) e admissão à UTI, e entre rs352162 (TLR9) e necessidade de ventilação mecânica.**

# RANTES

**INFECÇÃO POR VSR**



**AUMENTO DE ATIVIDADE DE QUIMIOCINAS**



**RECRUTAMENTO E INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS PARA O LOCAL DA INFILTRAÇÃO**

**RANTES é uma quimiocina produzida por linfócitos T CD8+, macrófagos, plaquetas e células epiteliais que atrai monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos T de memória para a área da infecção.**

**Nosso estudo demonstrou associação entre rs2280788 (RANTES) e admissão à UTI e entre rs2107538 (RANTES) e necessidade de ventilação mecânica.**

## **RECEPTOR DE VITAMINA D**

**A Viatmina D modula a proliferação e maturação de leucócitos e a expressão de Citocinas através do Receptor de Vitamina D nos linfócitos e macrófagos.**

**Estudos demonstraram a associação de baixos níveis de vitamina D e doenças respiratórias.**

**Dois estudos recentes demonstraram associação entre baixos níveis de Vitamina D em sangue de cordão umbilical e risco de bronquiolite por VSR no primeiro ano.**

**Nosso estudo demonstrou associação entre  
rs2228570 (VDR) e evolução à óbito.**

# **CONCLUSÕES**

## **CONCLUSÃO PRINCIPAL**

**A variabilidade dos genes da resposta imune contribui para a prevalência e a gravidade da Bronquiolite Viral Aguda.**

## **CONCLUSÕES SECUNDÁRIAS**

**A evolução mais grave da BVA está associada à:**

**Mãe com atopia**

**Pai com atopia**

**Irmãos com atopia**

**Baixa escolaridade materna**

**Maior número de irmãos**

**Maior número de pessoas na casa**

## **CONCLUSÕES SECUNDÁRIAS**

**Pacientes com VSR-B apresentam melhor evolução quando comparados a pacientes com outros vírus.**

**E no que isso  
pode contribuir?**



# O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA CONTRA O VSR É UMA PRIORIDADE NA SAÚDE PÚBLICA

- As tentativas até agora foram frustrantes.
- O conhecimento dos mecanismos pelos quais o VSR induz a patogênese é essencial para o desenvolvimento de uma vacina efetiva!!!



Human Respiratory Syncytial Virus: Role of Innate Immunity in Clearance and Disease Progression

Farrag MA – Viral Immunol 2016

Understanding respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development and aspects of disease pathogenesis

Jorquera PA – Expert Rev Vaccines 2016

# **DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DA RESPOSTA IMUNE**

- **Poderá contribuir para identificar os lactentes de alto risco que possam se beneficiar de medidas preventivas, seja através de diminuição da exposição ou através do Palimizumabe.**
  
- **Contribuirá com o melhor entendimento da patogênese e da resposta imune à infecção, o que poderá ajudar a desenvolver medidas terapêuticas mais efetivas.**

# **17 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

## **9 EM CONGRESSOS NACIONAIS**

**I Congresso Sul Brasileiro de Alergia e Imunologia em Pediatria – Florianópolis - Agosto de 2016**

**37 Congresso Brasileiro de Pediatria – Rio de Janeiro - Outubro 2015.**

**61 Congresso Brasileiro de Genética – Setembro de 2015.**

**X Congresso Brasileiro de Asma / XVI Congresso Paulista de Pneumologia e Tisiologia – Campos do Jordão - Agosto de 2015.**

**IX Semana de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – Maio de 2016**

# 17 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

## 8 EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS



**XI Congreso de la Sociedad  
Latinoamericana  
de  
Neumología Pediátrica –  
Florianópolis - Abril de 2016.**



**ERS INTERNATIONAL CONGRESS 2016**  
LONDON united kingdom, 3-7 september



**European Respiratory Society  
International Congress –  
Londres - Setembro de 2016.**





# **FINANCIAMENTO**

## **FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO**



## **FUNDAÇÃO ROBERTO ROCHA BRITO HOSPITAL VERA CRUZ**







# ESTUDO MULTIDISCIPLINAR E MULTICÊNTRICO



**Departamento de  
Pediatricia da FCM**  
**Setor de  
Pneumologia  
Pediátrica**



**Instituto de  
Biologia**  
**Setor de Virologia**



**Departamento de  
Genética Médica**

