

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Michelle Mergener

**Avaliação do dano de DNA em Células do
Epitélio Nasal de Lactentes com
Bronquiolite Viral Aguda.**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2014

Michelle Mergener

Avaliação do Dano de DNA em Células do Epitélio Nasal de Lactentes com Bronquiolite Viral Aguda.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Dr.Sérgio Luis Amantéa

Co-orientadora: Dra.Cláudia Ramos Rhoden

Porto Alegre

2014

Catálogo na Publicação

Mergener, Michelle

Avaliação do dano de DNA em células do epitélio nasal de lactentes com Bronquiolite Viral Aguda / Michelle Mergener. -- 2014.

134 p. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Orientador(a): Sérgio Luis Amantéa ; coorientador(a): Cláudia Ramos Rhoden.

1. Bronquiolite Viral Aguda. 2. Danos ao DNA. 3. Epitélio Nasal. 4. Lactente. I. Título.

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

Michelle Mergener

Avaliação do Dano de DNA em Células do Epitélio Nasal de Lactentes com
Bronquiolite Viral Aguda.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) como
requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Aprovação pela Banca em 02 de junho de 2014.

Componentes da Banca

Dra. Márcia Rosângela Wink

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Dr. Gilberto Bueno Fischer

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Dr. Renato Minozzo

Universidade Feevale - FEEVALE

Dr. Paulo José Cauduro Maróstica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Porto Alegre, setembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Embora uma tese seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus pais, pela compreensão e ternura sempre manifestadas apesar da falta de atenção e ausências, pela excitação e orgulho com que sempre reagiram aos meus resultados acadêmicos.

Ao meu amado esposo, Tomás, que sempre me estimula a crescer científica e pessoalmente. Acima de tudo, pelo inestimável apoio que tornou o convívio mais fácil e os dias mais coloridos, pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos.

Às minhas avós, Eneida e Glacy, e minhas irmãs, Rafaella e Júlia, pela excelente amizade, acolhimento e apoio manifestados. Pela disposição em me fazer sorrir tanto nos momentos difíceis quanto naqueles de descontração.

Ao Professor Dr. Sérgio Luis Amantéa, meu orientador, por me colocar o desafio de fazer esta tese, pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação. Pela competência científica e acompanhamento do trabalho, bem como pela disponibilidade, generosidade e amizade então demonstradas.

À Dra. Cláudia Ramos Rhoden, pela disponibilidade manifestada e pelo prestimoso apoio, por ceder os reagentes e equipamentos do laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Ambiental, o que em muito contribuiu para o desenvolvimento desta tese.

Aos Médicos, Enfermeiras e Residentes do Hospital da Criança Santo Antônio, por ter apoiado este trabalho indicando pacientes e me auxiliando na coleta das amostras e questionários.

Quanto mais um homem se aproxima de suas
metas, tanto mais crescem as dificuldades.

Goethe

RESUMO

A Bronquiolite Viral Aguda (BVA) é uma doença de alta morbidade prevalente em todo o mundo, caracterizada por infecção do trato respiratório, principalmente devido a presença do Vírus Sincicial Respiratório humano (VSR). A avaliação da capacidade mutagênica viral e da exposição ambiental relacionada com a BVA no início da vida sobre o epitélio nasal através do ensaio de micronúcleos pode ser uma ferramenta não invasiva. Este estudo tem como objetivo avaliar a exposição ambiental a fumaça de cigarro relacionando-a a frequência de anomalias nucleares pelo ensaio de micronúcleos em células nasais de vias aéreas superiores de lactentes com BVA e com positividade VSR no primeiro ano de vida, em comparação com indivíduos sem BVA pareados por idade e gênero. 80 lactentes participaram do estudo, 40 delas com BVA e VSR. A exposição à fumaça de cigarro passiva e os hábitos tabácicos maternos e de pessoas que habitavam a mesma residência aumentaram as chances do lactente desenvolver BVA mais de 11 vezes do que aqueles cujos arredores não apresentavam relatos de poluentes relacionados com cigarros. A frequência de micronúcleos, células binucleadas, com cromatina condensada, núcleos picnóticos e células com brotos nucleares não foi diferente entre os grupos. Os lactentes com BVA apresentaram maior frequência de células cariorréticas ($17,25 \pm 5,72$ vs $12,35 \pm 7,56$) e cariолíticas ($121,22 \pm 36,18$ vs $106,90 \pm 33,23$). Tais pacientes têm uma tendência a apresentar taxas mais elevadas de células necrosadas, portanto, pode-se supor a atividade VSR possa desencadear processos de morte celular antes mesmo que a presença de outras anormalidades nucleares fosse detectada. Considerando a escassez de informações sobre a frequência de dano celular entre as crianças, estes resultados podem ser precursores de novas perspectivas para a compreensão BVA, uma doença tão prevalente na população pediátrica.

Palavras-chave: Bronquiolite Viral Aguda, danos ao DNA, Epitélio Nasal, Lactentes.

ABSTRACT

The Acute Viral Bronchiolitis (AVB) is a prevalent disease with high morbidity worldwide, characterized by respiratory infection, mainly due to the presence of the Human Respiratory Syncytial Virus (RSV). The evaluation of viral mutagenic capacity and environmental exposure related to BVA in early life on the nasal epithelium by micronucleus assay can be a noninvasive tool. This study aims to assess environmental exposure to cigarette smoke relating to the frequency of nuclear anomalies by micronucleus assay in nasal cells of the upper airways of infants with AVB and positive RSV in the first year of life compared with individuals without AVB matched for age and gender. 80 infants participated, 40 of them with AVB and RSV. Maternal and passive smoking from people who lived in the same residence increases the odds of infants develop AVB more than 11 times than those whose surroundings were clear of pollutants related to cigarettes. The frequency of micronucleated, binucleated, cells with condensed chromatin, pyknotic nuclei and cells with nuclear buds was not different between groups. Infants with AVB showed higher frequency of karyorrhetic cells (17.25 ± 5.72 vs. 12.35 ± 7.56) and karyolytic cells (121.22 ± 36.18 vs. 106.90 ± 33.23). Such patients tend to present higher rates of necrosed cells, hence it may be assumed the RSV activity can unleash cell death processes even before the presence of other nuclear abnormalities were detected. Considering the lack of information regarding the frequency of cellular damage among infants, these results may be precursors of new perspectives for understanding AVB, such prevalent disease in the pediatric population .

Keywords: Acute Viral Bronchiolitis, DNA damage, Nasal epithelium, Infants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia do aparelho respiratório superior	14
Figura 2 - Tipos celulares encontrados na mucosa nasal	15
Figura 3 - Alterações nucleares capazes de serem encontradas a partir de uma célula epitelial basal.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequency of nuclear abnormalities from infant's nasal cells 80

Tabela 1 – General characteristics of the studied infants 96

Tabela 2 – Nuclei abnormalities frequencies per 2000 cells and the characteristics
of the family environmental of studied infants 97

Tabela 3 – Logistic regression models with the questionnaire factors 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Pediatria
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
BD	Broncodilatador
BVA	Bronquiolite Viral Aguda
CRF	Capacidade Residual Funcional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Imunoensaio Enzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FR	Fisioterapia Respiratória
HP	Hiperinsuflação Pulmonar
IFA	Imunofluorescência
IFD	Imunofluorescência Direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
IL	Interleucina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IRA	Insuficiência Respiratória Aguda
MGG	May-Grunwald/Giemsa
MN	Micronucleo
mrn	movimentos respiratórios por minuto
OMS	Organização Mundial da Saúde
PaO ₂	Pressão de Oxigênio
PCO ₂	Pressão de Dióxido de Carbono
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcrição Reversa Multiplex
SatHb	Saturação de Hemoglobina
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TR-FIA	Imunofluoroensaio de Resolução por Tempo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Luz Ultravioleta
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
V/Q	Relação Ventilação Perfusão

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 Introdução	12
1.2 O epitélio respiratório	13
1.3 Bronquiolite Viral Aguda (BVA)	17
1.3.1 Etiologia da BVA.....	17
1.3.2 Quadro Clínico da BVA	21
1.3.3 Características Epidemiológicas da BVA	24
1.3.4 Fatores intrínsecos de predisposição à BVA.....	25
1.3.5 Fatores ambientais de predisposição á BVA.....	27
1.3.6 Diagnóstico diferencial da BVA	29
1.3.7 Tratamento da BVA.....	34
1.3.8 Prevenção e imunização contra o VSR.....	40
1.4 Avaliação do dano de DNA	42
1.4.1 A técnica de micronúcleos em células nasais	44
1.4.2 Alterações nucleares.....	47
1.4.2.1 Os micronúcleos (MNs).....	47
1.4.2.2 Os brotos nucleares (BUDs).....	48
1.4.2.3 As células binucleadas	49
1.4.2.4 Núcleos com cromatina condensada.....	49
1.4.2.5 As células em processo de cariorrexe.....	50
1.4.2.6 As células com núcleo picnótico.....	50
1.4.2.7 As células em cariolise	51
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO	52
3 OBJETIVOS	67
3.1 Objetivo Geral	67
3.2 Objetivos Específicos	67
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	68
4.1 <i>Nuclear abnormalities in cells from nasal epithelium: a promise assay to evaluate DNA damage related to air pollution in infants.....</i>	69
4.2 <i>DNA damage assessment in nasal cells from infants with Acute Viral Bronchiolitis.....</i>	81
5 CONCLUSÃO	99
6 APÊNDICE	100
APÊNDICE 1 Questionário aplicado	100
APÊNDICE 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	xxx
7 ANEXOS	101
ANEXO 1: Parecer de aprovação do Comitê de Ética da UFCSPA.....	101
ANEXO 2: Resposta de aceite para publicação do Jornal de Pediatria .	102
ANEXO 3: Normas para autores do Jornal de Pediatria	103

ANEXO 4: Normas para autores da Revista <i>The Pediatrics Infectious Disease Journal</i>	114
--	-----

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Introdução

Bronquiolite Viral Aguda (BVA) é uma infecção do trato respiratório inferior que compromete de forma obstrutiva as vias aéreas de pequeno calibre (bronquíolos). Ocorre através de um processo inflamatório agudo com graus variáveis de intensidade, cujo principal agente etiológico é o Vírus Sincicial Respiratório (VSR). Fatores epidemiológicos e ambientais como prematuridade e tabagismo passivo também parecem estar associados à sua evolução para formas mais graves (PITREZ et al., 2005; MUCCIOLLO et al, 2008).

É uma doença de elevada morbidade em todo o mundo, principalmente nos meses de inverno, e constitui-se na infecção mais frequente em lactentes com menos de dois anos de idade (AMANTÉA e SILVA, 1998).

Independentemente da frequência da ocorrência da BVA na população pediátrica e dos fatores considerados de risco para o seu desenvolvimento, os mecanismos responsáveis pelos desfechos clínicos a serem desenvolvidos permanecem alvo de contínua investigação. Portanto, um melhor entendimento de sua evolução se faz essencial para a prevenção e avaliação prognóstica (GLUCK e GEBBERS, 2000).

Assim, o estudo da possível capacidade mutagênica do VSR e da exposição ambiental relacionados à BVA no início da vida pode aumentar o conhecimento em relação às possibilidades terapêuticas, duração, evolução e termo dessa doença, além do surgimento e frequência da sibilância recorrente durante a infância. Nesse sentido, a determinação das alterações citogenéticas e em nível de DNA podem se tornar importantes marcadores de suscetibilidade de risco individual.

Uma das formas de avaliar a taxa de dano ao DNA celular é através da análise de alterações nucleares. Tais análises, quando realizadas com células oriundas do epitélio nasal, têm sido utilizadas como uma forma alternativa e não invasiva de biomonitorar populações humanas expostas a agentes mutagênicos (HUEN et al., 2006), fato que o torna de grande valia principalmente quando se pretende avaliar os efeitos de exposição entre indivíduos de pouca idade em um tecido alvo da poluição ambiental.

Na BVA, a utilização de técnicas que refletem o dano de DNA tem sido pouco explorada, apesar do seu potencial na avaliação prognóstica já ter sido empregada em outras doenças respiratórias em crianças e adultos (MALUF et al., 2007; ROSSNEROVA et al., 2011), em casos de exposição ocupacional (SURUDA et al., 1993; HUVINEN et al., 2002; YE et al., 2005; ALEXANDRESCU et al., 2006; DE BORTOLI et al., 2009; DEMIRCIGIL et al., 2010; MINOZZO et al., 2010; DILER e CELIK, 2011) e para a avaliação de exposição ambiental, inclusive em crianças e neonatos (NERI et al., 2005; HUEN et al., 2006; ARAGONÉS et al., 2008; CORONAS et al., 2009; REKHADEVI et al., 2009; HOLLAND et al., 2011; SISENANDO et al., 2012).

Portanto, este trabalho pretende analisar os índices que refletem a instabilidade genética, como a frequência de anomalias nucleares, em células das vias aéreas superiores de lactentes acometidos de BVA e com testes de imunofluorescência (IFA) positivos para VSR no primeiro ano de vida, comparando-as com aqueles sem BVA. Além disso, este estudo propõe-se a correlacionar tais frequências com os hábitos tabágicos dos pais e familiares que habitam a mesma residência.

1.2 O Epitélio Respiratório

O trato respiratório pode ser visto como uma unidade morfofuncional, composto por uma porção condutora (nariz, nasofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos terminais) e uma porção respiratória (bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos). A primeira filtra, umidifica e aquece o ar, condicionando-o para sua entrada nos pulmões, enquanto a segunda é responsável pelas trocas gasosas entre o ar alveolar e o sangue (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A porção condutora da árvore respiratória é totalmente recoberta em sua luz pela mucosa respiratória. A mucosa nasal e brônquica tem arquitetura semelhante, caracterizada por epitélio pseudoestratificado, com células ciliadas colunares apoiadas sobre a membrana basal. São compostos basicamente por quatro tipos de células: células basais, capazes de diferenciar-se em outras células; células colunares ciliadas, caracterizadas por apresentar a face apical coberta por 50 a 200 cílios; células colunares não ciliadas, que possuem microvilosidades envolvidas nos processos de umidificação, aquecimento e filtração do ar; e células caliciformes, as

quais produzem muco, principalmente quando estimuladas por partículas irritantes e poluentes (CAMARGOS et al., 2002).

Devido ao alargamento da superfície da cavidade nasal por três conchas, este epitélio cobre uma área de aproximadamente 120cm^2 (Figura 1). As conchas inferiores e médias são caracterizados por mucosa respiratória com epitélio ciliar colunar estratificado (KNASMUELLER et al., 2011).

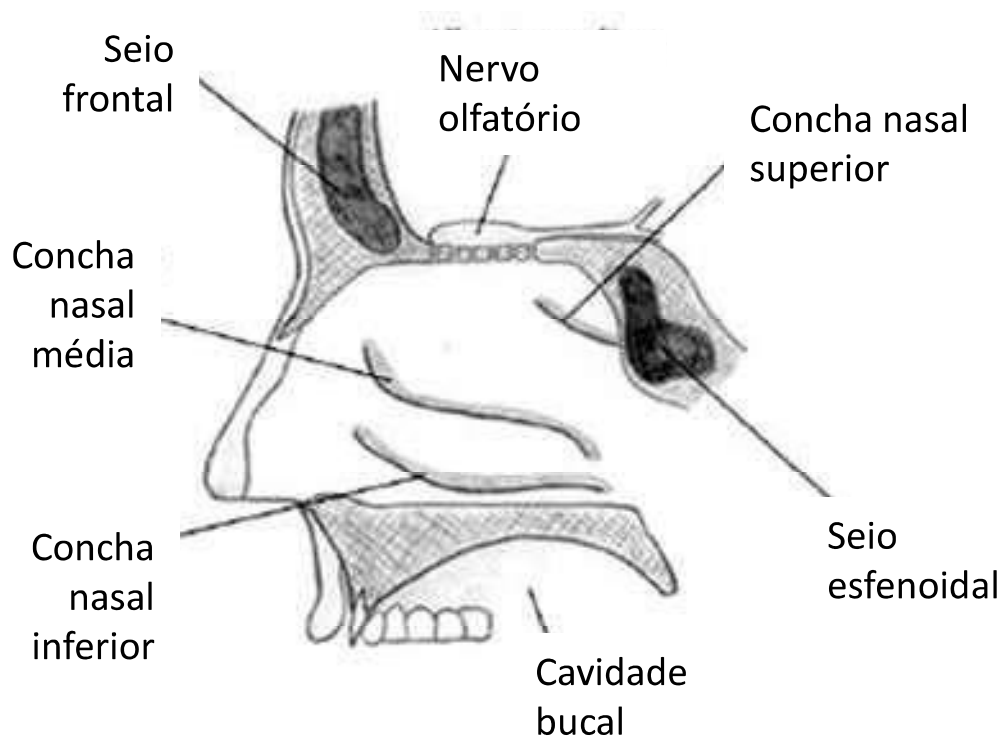


Figura 1- Anatomia do aparelho respiratório superior (adaptado de KNASMUELLER et al., 2011).

As células basais são posicionadas nas partes mais profundas seguidas pelas camadas intermediárias que contém células não ciliadas, enquanto que a camada mais superficial apresenta células colunares, ciliadas e maduras. São intercaladas pelas células caliciformes não ciliadas que contém mucina. A região apical das células ciliadas é ancorado às células ciliadas e as caliciformes adjacentes. A parte superior da cavidade e a parte inferior do septo são cobertas por mucosa olfativa que contém células sensoriais primárias (Figura 2) (KNASMUELLER et al., 2011).

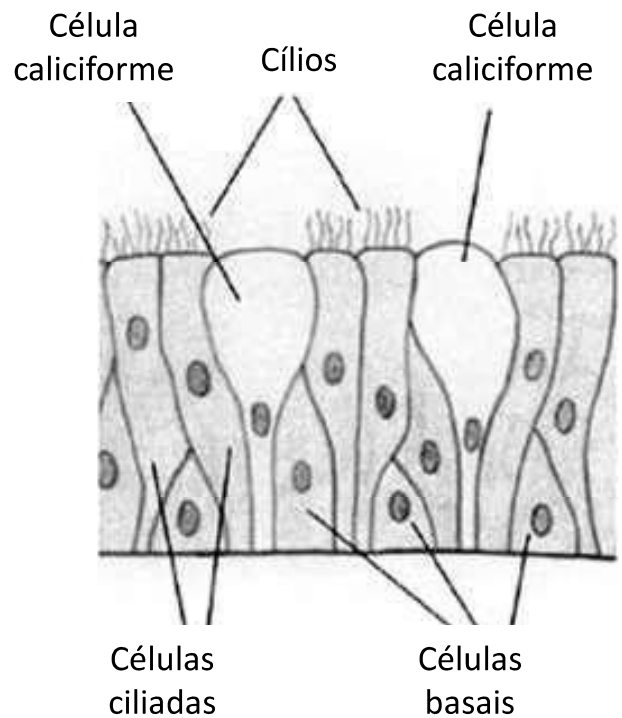


Figura 2 - Tipos celulares encontrados na mucosa nasal (adaptado de KNASMUELLER et al., 2011).

Este epitélio é recoberto na sua superfície apical pelo muco, um manto líquido delgado que contém água, glicoproteínas, imunoglobulinas (IgA, IgG e IgE), macromoléculas (lisoenzimas, lactoferrinas) e íons. O muco constitui a primeira linha de defesa das vias aéreas contra alérgenos inalados, bactérias e poluentes, principalmente porque proporciona uma camada adesiva para a deposição de partículas inaláveis e para a absorção de gases. A camada mucociliar participa ativamente da homeostase respiratória por meio de uma série de mecanismos protetores, que incluem a função ciliar, a secreção de muco e a liberação de mediadores inflamatórios em resposta aos estímulos ambientais deletérios. Assim, as partículas estranhas são removidas no muco e a ação ciliar propela a camada inteira de muco em direção à nasofaringe, onde é deglutida, promovendo uma limpeza fisiológica da cavidade nasal (TABARY et al., 2001; PAPSIN e McTAVISH, 2003; KNASMUELLER et al., 2011).

Alterações no funcionamento deste mecanismo de transporte podem ocasionar mudanças na qualidade do ar inspirado e, conseqüentemente, em disfunções respiratórias de intensidades variáveis, bem como propiciar a instalação de processos inflamatórios e infecciosos, capazes de afetar a mucosa nasossinusal como um todo. A inflamação estimula a conversão de células ciliadas em

caliciformes, tornando o muco mais espesso e, assim, dificultando sua remoção e facilitando o crescimento bacteriano (MARTIN et al., 1997).

As manifestações patológicas nas vias respiratórias de fumantes ativos e/ou passivos são o aumento na produção de muco e a diminuição dos movimentos ciliares da célula ciliada. Estas alterações podem ser interpretadas como uma resposta adaptativa da área respiratória quando submetida a uma agressão crônica (MARTIN et al., 1997).

Em praticamente toda a sua extensão, a mucosa do trato respiratório é rica em mastócitos e tecido linfóide, constituindo o chamado “tecido linfóide associado à mucosa ou ao brônquio”. Na submucosa, encontram-se vasos sanguíneos, glândulas mucosas, nervos e células inflamatórias, a saber, monócitos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos (CAMARGOS et al., 2002).

Paralelamente a essas características comuns, existem diferenças com relação a rede vascular e nervosa. O nariz, além de ser um compartimento rígido, apresenta uma ampla rede vascular composta por ramos das artérias nasal lateral posterior e nasosseptal, por ramos da artéria oftálmica e por capilares subepiteliais. Esta rica vascularização é a origem da obstrução nasal, manifestação primordial nos processos inflamatórios do nariz. A via aérea inferior, por sua vez, caracteriza-se pela sua plasticidade e pela presença de músculo liso da traquéia aos bronquíolos, o que explica a broncoconstrição que ocorre no asmático, por exemplo (CAMARGOS et al., 2002).

A inervação da mucosa nasal se faz por fibras adrenérgicas, colinérgicas e, finalmente, sem que ainda tenha sido claramente definida sua função, por fibras não adrenérgicas não colinérgicas. Neurotransmissores e neuropeptídeos (esses últimos, também identificáveis no tecido bronquial) do sistema nervoso autônomo são responsáveis pelo controle da homeostase, isto é, regulam a permeabilidade vascular e os processos secretórios. A inervação colinérgica é a principal via efetora da broncoconstrição. O controle adrenérgico se faz no nariz e nos brônquios, por mecanismos diferentes; os agonistas α -adrenérgicos são potentes vasoconstritores nasais, enquanto que os β 2-adrenérgicos são potentes broncodilatadores (CAMARGOS et al., 2002).

1.3 A Bronquiolite Viral Aguda (BVA)

Descrita pela primeira vez em 1901 por Holt como “Bronquiolite Catarral Aguda”, a Bronquiolite Viral Aguda (BVA) somente foi assim designada na década de 40 quando postulada sua etiologia viral (ENGLE e NEWNS, 1940).

1.3.1 Etiologia da BVA

O Vírus Sincicial Respiratório (VSR) é considerado o principal agente etiológico, embora outros vírus também possam estar associados a esta doença como Adenovírus 1, 3, 7 e 21, Bocavírus, Influenza A e B, Metapneumovírus, Parainfluenza 1, 2 e 3, Rinovírus e, menos frequentemente, o *Mycoplasma pneumoniae*. Além disso, o estabelecimento de codetecção ou coinfecção tem sido um aspecto crítico a ser considerado. No Brasil, por exemplo, foi verificado que em 40% dos casos de BVA ocorre coinfecção viral, e que o vírus mais frequente após o VSR é o Rinovírus. (WOHL e CHERNICK, 1978; WELLIVER e WELLIVER, 1993; NASCIMENTO et al, 2010; ALVAREZ et al, 2013).

O VSR pertence ao gênero *Pneumovirus* e família dos *Paramoxaviridae*. Seu envelope é composto por glicoproteínas G, responsáveis pela fixação do vírus especificamente às células do epitélio respiratório do hospedeiro e, glicoproteínas F, facilitadoras da fusão entre as membranas viral e celular, permitindo a inserção do RNA nas células do hospedeiro. Contém uma única hélice de RNA viral com, pelo menos, 10 polipeptídeos (RUUSKANEN e OGRA, 1993; LEVY e GRABER, 1997; DARVILLE e YAMAUCHI, 1998; FRANKEL e DEDRISH, 1999; WELLIVER, 2003).

Existem 2 tipos de VSR, A e B, que diferem entre si pelos antígenos relacionados à proteína G. O tipo A é considerado mais virulento e mais prevalente (HALL et al., 1990; TOMS, 1990; WANG et al., 1995; LEVY e GRABER, 1997; WELLIVER, 2003).

Desde a década de 50, quando foi descoberto, o VSR tem sido reconhecido como a causa mais importante de BVA, principalmente em casos de hospitalização por doença respiratória aguda em lactentes (KIMPEN, 2002; FRANKEL e DERISH, 1999, STENSALLE et al., 2003; WELLIVER, 2003; BRANDENBURG et al 1997; SIMÕES, 1999).

Apesar de aproximadamente 80% dos lactentes entrarem em contato com o VSR durante o primeiro ano de vida e, virtualmente, ao longo dos 3 primeiros anos de idade, todas as crianças serão expostas a esse vírus, a maioria dos casos é leve e não produz sequelas (ALVAREZ et al, 2013). O VSR é, em geral, responsável por 40% a 80% dos casos de BVA. Na Austrália, sua incidência varia de 11% a 22,6% entre lactentes (RANMUTHUGALA et al., 2011). Em estudos conduzidos no Brasil, o VSR foi responsável por 24% a 64% dos pacientes internados com BVA (MOURA et al, 2003; THOMAZELLI et al., 2007; SALOMAO JUNIOR et al., 2011). Na Europa, o VSR é responsável por 45% das hospitalizações por infecção das vias aéreas inferiores em menores de dois anos (SIMÕES e CARBONELL-ESTRANY, 2003).

A prevalência de hospitalização por VSR decai conforme o avanço da idade da criança. Nos Estados Unidos, num estudo conduzido entre 1999 e 2006, foi constatada uma taxa de hospitalização por VSR de 4,9% em lactentes menores de 3 meses, de 2,6% em menores de 1 ano, e de 0,18% em crianças de 1 a 5 anos, acarretando em torno de 132.000 e 172.000 hospitalizações por ano por VSR em menores de cinco anos de idade (STOCKMAN et al., 2012).

Em outras regiões, a taxa de hospitalização de lactentes com VSR varia de 0,87% na Austrália (RANMUTHUGALA et al., 2011) a 0,60% no Japão (SIMÕES e CARBONELL-ESTRANY, 2003).

Com o objetivo de descrever os impactos clínicos e econômicos da infecção pelo VSR entre crianças com menos de 2 anos de idade internadas em um hospital no Reino Unido em um período de 3 anos, Deshpande e Northern (2003) observaram que 2,7% foram admitidas na unidade de terapia intensiva (UTI), 1,5% necessitaram ventilação assistida e 0,2% foram a óbito. Os custos com hospitalizações e imunoprofilaxia naquele país chegam a mais de 600 mil libras.

Nos Estados Unidos ocorrem de 3.000 a 4.000 mortes anuais devido ao VSR. Neste país, ocorrem, em média, 22,8 visitas a emergência por infecções por VSR para cada 1.000 lactentes, sendo que 29% acabam sendo hospitalizados. A maior taxa de hospitalização encontra-se entre crianças com menos de um ano de idade (2,3%), seguido da faixa etária entre 1 a 4 anos (0,18%) (ZHOU et al., 2012).

O VSR é um vírus muito contagioso. Sua transmissão ocorre através do contato com secreções respiratórias, onde é capaz de permanecer viável por até 6 horas, ou gotículas capazes de contaminar mãos e objetos. É comum ocorrer disseminação do VSR entre familiares e no ambiente escolar. Em hospitais, pode

causar epidemias e, nestes casos, a morbidade é significativa (DARVILLE e YAMAGUCHI, 1998).

Os pacientes infectados secretam o VSR por 2 a 4 semanas, período no qual permanece detectável na secreção nasofaríngea. A maioria dos pacientes apresenta infecção das vias aéreas superiores, mas somente 40% apresenta o acometimento do trato respiratório inferior já na primeira infecção (DARVILLE e YAMAGUCHI, 1998; FRANKEL e DERISH, 1999).

Os sítios de entrada do VSR no organismo são os olhos e o nariz, inoculando-se por tais vias nas células epiteliais do trato respiratório superior. Pela transmissão célula-célula, o vírus alcança o trato respiratório inferior, onde permanece intracelular nos primeiros 3 a 4 dias, período no qual os sintomas ainda não são evidenciados. A intensa replicação viral é atingida após o quarto ou quinto dia após a infecção, período no qual o paciente mostra-se sintomático (JAFRI, 2003; DARVILLE e YAMAGUCHI, 1998; LEVY e GRABER, 1997).

Sabe-se que a BVA é uma doença com padrão sazonal, mas a razão para a periodicidade de infecções pelo VSR ainda não está bem definida na literatura. Fatores climáticos e geográficos estão bem relacionados às epidemias, mas sua relação com fatores como a difusão viral, comportamentais ou mudanças na suscetibilidade da população ainda exigem maiores esclarecimentos (SIMÕES e CARBONELL-ESTRANY, 2003).

A infecção pelo VSR tem gravidade variável, com manifestações clínicas que vão desde sintomas leves em vias aéreas superiores até BVA e pneumonia, podendo evoluir para uma forma grave, com necessidade de internação em UTI, ventilação mecânica e, até mesmo, óbito. As primeiras infecções geralmente são sintomáticas e frequentemente atingem as vias aéreas inferiores, sendo as infecções subsequentes geralmente mais leves (ALVAREZ et al, 2013).

O VSR também pode apresentar manifestações clínicas extra-pulmonares. Quando há o envolvimento do sistema nervoso central, pode causar meningite, mielite ou hemiplegia. Quando acomete o sistema cardiovascular, pode estar associado a quadros de miocardite, arritmias e diminuição da função miocárdica. A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) também é um quadro ao qual podem evoluir os lactentes com menos de seis semanas de vida. Tal síndrome assemelha-se ao choque séptico, sendo necessário a ressuscitação volumétrica com suporte inotrópico (FRANKEL e DEDRISH, 1999).

Há certa evidência de que os vírus, em especial o VSR, são capazes de promover certa sensibilização alérgica e, por isso, podem estar relacionados ao surgimento de asma precoce e à sua persistência na idade escolar (MARTINEZ et al., 1995; STEIN et al., 1999; CARROL et al., 2009). Kusel e colaboradores (2007) relataram importante associação entre a infecção pelo VSR e sibilância recorrente aos 5 anos em pacientes com sensibilização alérgica precoce.

A caracterização da sibilância nos primeiros anos de vida é bastante heterogênea, dependendo da frequência dos episódios, da gravidade, da idade de início e dos fatores associados, como infecções virais e presença de atopia. Embora a asma seja a mais comum, geralmente a criança que sibila, o faz por infecções das vias aéreas, notadamente o VSR, ou em decorrência de quadros que mimetizam o ruído, levando a confusão e dificultando o diagnóstico, como aspiração de corpo estranho, obstrução de via aérea superior, fibrose cística, má formação congênita pulmonar e doença do refluxo gastroesofágico (GINA, 2012).

Apesar da diversidade de critérios, geralmente se aceita que, após três ou mais episódios de sibilância na infância, pode-se afirmar que o lactente apresenta sibilância recorrente (DELA BIANCA et al., 2010).

No ano de 2008, Barcharier e colaboradores publicaram um consenso sobre a sibilância na faixa etária pediátrica até os cinco anos e reforçaram a sua divisão em 4 padrões distintos estabelecidos pelas Academias Europeia e Americana de Asma, Alergia e Imunologia. Desta forma, os pacientes com asma normalmente se encontram em algum desses padrões: Sibilância transitória, apresentando sibilos durante os três primeiros anos de vida e não mais após essa idade; Sibilância não atópica, desencadeada principalmente por infecção respiratória aguda, geralmente induzida por vírus, principalmente o VSR, tende a desaparecer até a idade escolar e geralmente é assintomática; Asma persistente, com a sibilância associada a manifestações clínicas de atopia, eosinofilia e/ou níveis séricos elevados de IgE total ou sensibilização comprovada a alimentos e/ou aeroalérgenos ou ter pai e/ou mãe com asma; Sibilância intermitente grave, caracterizada por episódios pouco frequentes de sibilância aguda associados a poucos sintomas fora dos quadros agudos, e com a presença de características de atopia (STEIN et al., 1999; HEINZMANN et al., 2004; WRIGHT et al., 2006; BARCHARIER et al., 2008).

Reinfecções são comuns em todas as idades, e o mesmo subtipo de vírus pode ser o responsável, uma vez que o VSR não confere imunidade. Além disso, a

prevenção do contágio por VSR parece ser mais indicada e ter maior sucesso do que o tratamento disponível (DARVILLE e YAMAGUCHI, 1998; SIMÕES, 1999; STEIN et al., 1999; BONT e RAMILO, 2011).

1.3.2 Quadro Clínico da BVA

A BVA é caracterizada por uma inflamação aguda que inicia nas vias aéreas superiores, precedida de um quadro respiratório inferior, o qual acomete predominantemente os bronquíolos. A tríade patogênica inclui edema de mucosa, descamação epitelial e hipersecreção brônquica, que causará uma obstrução parcial ou total. Os sintomas típicos e a obstrução das vias aéreas ocorrem entre quatro a cinco dias após a infecção, precedendo um período de latência viral, e é quando a cascata inflamatória se estabelece (PANITCH, 2003; MUCIOLLO et al, 2008).

Na obstrução parcial das pequenas vias aéreas, ocorre hiperinsuflação pulmonar (HP) ou aumento da capacidade residual funcional (CRF), aumento das resistências inspiratórias e expiratórias e hipoventilação alveolar (efeito shunt) com hipoxemia. Já na obstrução total ocorre a atelectasia (área de shunt) que é o colapso alveolar onde acontece a perda da função e do volume da estrutura pulmonar. A atelectasia pode acometer uma parte ou todo o pulmão ocorrendo redução da relação ventilação perfusão (V/Q), alteração da pressão parcial de oxigênio alveolar (PaO_2), possível diminuição da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) por aumento da frequência respiratória, redução da CRF e redução da saturação periférica de oxigênio (CARVALHO et al., 2002).

No entanto, é a combinação de fatores que vão desde o efeito citopatológico direto do VSR sobre as células respiratórias até a resposta inflamatória do hospedeiro, que induz a patologia da BVA em direção ao trato respiratório inferior e, assim, a sua sintomatologia característica (JAFRI, 2003).

A obstrução total ou parcial das vias aéreas de pequeno calibre é causada pela formação de tampões mucosos e de células necrosadas. Isto porque a infecção do epitélio bronquiolar pelo VSR leva a necrose com infiltração mononuclear e edema submucoso. Assim, o estreitamento dos bronquíolos impede a saída do fluxo de ar durante a expiração e, a hiperinsuflação ocorre devido ao alçapamento de ar nas vias periféricas com obstrução parcial. Quando há obstrução total, ocorrem nas

áreas de atelectasias (RUUSKANEN e OGRA, 1993; DARVILLE e YAMAUCHI, 1998; WOHL e CHERNICK, 2003).

A mucosa do trato respiratório lesada pela necrose expõe os receptores do sistema nervoso autônomo, o que parece ser responsável pela estimulação dos receptores parassimpáticos levando a broncoconstrição (FRANKEL e DERISH, 1999).

Existem evidências de que a BVA seja uma doença imunomediada. É possível que as células do sistema imunológico venham a contribuir para a inflamação da via aérea, ativando uma complexa rede de reações imunológicas com a participação de células T, macrófagos e aumento na produção de IgE específica para o VSR na nasofaringe (AMANTÉA e SILVA, 1998).

A resposta imune inicial a infecção pelo VSR é mediada por células ou por anticorpos. As células epiteliais e os macrófagos alveolares são a chave para a ativação de imunidade celular após a infecção. Elas produzem mediadores, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como as Interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral α e a proteína macroinflamatória-1- α . Esta produção é parcialmente responsável pela inflamação das vias aéreas, pela hiperresponsividade brônquica, assim como pelos sintomas do trato respiratório superior. Alguns estudos ainda sugerem a correlação de mediadores inflamatórios e resposta imune com a gravidade da doença, podendo até no futuro serem usados como preditores de gravidade. Em crianças menores de seis meses a imunidade humoral é primariamente constituída por IgA nas secreções respiratórias e IgG sérica. Esta resposta é mais forte se a infecção ocorre após esta idade (JAFRI, 2003; WELLIVER, 2003).

Dentre os sinais que caracterizam o acometimento do trato respiratório inferior, destacam-se coriza, febre baixa, tosse, dispneia, uso de musculatura acessória ao respirar (subcostal, intercostal e supra-esternal), batimento de asas do nariz, dificuldade para mamar, com evolução, nos dias subsequentes, que acompanha taquipnéia, sibilos na ausculta pulmonar, aumento do tempo expiratório, crepitações e sinais de dificuldade ventilatória (RUBIN e FISCHER, 2003).

Tais sintomas juntamente com a obstrução das vias aéreas costumam ocorrer de 8 a 12 dias após a infecção, quando o processo inflamatório já está bem estabelecido. No entanto, em alguns casos, a apnéia pode ser o único sinal de BVA,

especialmente em lactentes com menos de dois meses (KNEYBER et al., 1998; SIMÕES, 1999; MALLORY et al., 2003; PANITCH, 2003).

O quadro clínico dos pacientes com esta doença varia desde leve, moderado ou grave, estando, geralmente relacionada com o processo inflamatório causado pelo vírus, resultando na infiltração de neutrófilos, linfócitos e liberação de mediadores inflamatórios. Neste caso, estes provocam edema, espasmo muscular e maior produção de muco, o qual não consegue ser eficientemente eliminado através de mecanismo mucociliar. Por consequência disto, ocorre a obstrução grave e o aumento da resistência das vias aéreas de menor calibre, além da relação V/Q alterada que resulta em hipóxia e retenção de dióxido de carbono, sinais de evidente gravidade (RUUSKANEN e OGRA, 1993; WANG et al., 1995).

Sinais de sofrimento respiratório, com ou sem falência, e comprometimento circulatório também podem ocorrer nos casos mais graves, que podem progredir para Insuficiência Respiratória Aguda (IRA). Presença de cianose, correlacionada com a saturação de oxigênio inferior a 90%, constitui um sinal bastante preocupante (MULHOLLAND et al., 1990; FRANKEL e DERISH, 1999; MALLORY et al., 2003).

Apesar de a mortalidade ser baixa a BVA é considerada a causa mais comum de internações hospitalares por doença obstrutiva das vias aéreas inferiores nos primeiros dois anos de vida, já que é uma das principais causas de IRA, a qual pode levar à ventilação mecânica invasiva em lactentes em UTI pediátrica (PITREZ et al., 2003; ALMEIDA JR et al., 2005). Além disso, esta é uma doença de elevada morbidade entre lactentes previamente saudáveis em todo o mundo, estando fortemente associada não só ao primeiro episódio de sibilância, como também a sua recorrência durante a infância (PITREZ et al., 2005).

De forma geral, a BVA é uma doença de evolução benigna. Os quadros leves e moderados podem ser tratados em nível ambulatorial, ou até mesmo em casa, sendo importante a garantia de uma boa hidratação, do controle da febre e de observação pela equipe médica. Contudo, cerca de 0,5 a 2% das crianças com menos de um ano de idade necessitam de hospitalização, notadamente aquelas entre 2 e 5 meses (MEERT et al., 1989; WAINWRIGHT et al., 2003; WELLIVER, 2003).

Em países desenvolvidos, aproximadamente 1,5% dos pacientes necessitam de admissão hospitalar. No Brasil, estudo com 5.304 crianças menores de um ano demonstrou que 113 (2,1%) foram internadas por BVA (ALBERNAZ et al., 2003). A

melhora clínica, na maioria dos casos, ocorre entre 48 a 72 horas, mantendo o tempo médio de internação de 4 a 7 dias (MEERT et al., 1989; WELLIVER, 2003).

Dentre as crianças internadas, 15% necessitam de transferência para UTI. Destes, de 3% a 8% desenvolvem falecia respiratória, sendo necessária a intervenção com ventilação mecânica e, 1% evoluem a óbito (NICOLAI e POHL, 1990; FRANKEL e DERISH, 1999; WAINWRIGTH et al., 2003; WELLIVER, 2003; BRANDENBURG et al., 1997). No Brasil, estudos epidemiológicos sobre etiologia de BVA confirmam os resultados de estudos em países desenvolvidos, fundamentando sua importante prevalência e seu impacto em termos de saúde pública (SUTMOLLER et al., 1995; STRALIOTTO et al., 2002).

O melhor preditor de gravidade da doença é a saturação de oxigênio da hemoglobina (SatHb) do lactente medida por oximetria de pulso. Outros parâmetros fisiopatológicos são limitados em identificar lactentes com alto risco (SHAW et al., 1991). No entanto, alguns estudos foram conduzidos a fim de predizer piores prognósticos entre lactentes. Dentre eles, Brooks e colaboradores (1999), observaram que a frequência respiratória superior a 80 movimentos respiratórios por minuto (mrm) e SatHb inferior a 85% apresentam especificidade de 97%, mas sensibilidade de 30%.

A mortalidade das crianças hospitalizadas varia em torno de 1% naquelas previamente híginas e 3,5% nas crianças com história prévia de problemas cardíacos, displasia broncopulmonar e prematuridade (RUUSKANEM e OGRA, 1993; FRANKEL e DERISH, 1999).

O desenvolvimento de sibilância recorrente durante a infância frequentemente é associado com quadros de hospitalização prévios de BVA. Alguns estudos demonstram que crianças hospitalizadas por BVA têm de 50% a 62% mais chances de desenvolver episódios de sibilância posteriores (RUBIN e FISCHER, 2003).

1.3.3 Características Epidemiológicas da BVA

A BVA apresenta um quadro epidemiológico que segue um padrão sazonal. Em países de clima temperado, as infecções pelo VSR ocorrem nos meses de outono, inverno e primavera, enquanto que em locais de climas semitropical e tropical, as epidemias são mais regulares, com apenas alguma influência de sazonalidade. Nestas áreas, por exemplo, os casos de BVA estão mais associados

a diminuição da temperatura com aumento das chuvas no hemisfério Norte e com diminuição das chuvas no hemisfério Sul. Nas regiões equatoriais, em contrapartida, as epidemias costumam ocorrer nos meses mais secos. Entretanto, dependendo do ano e da localidade, pode haver variações significativas quanto à época e a duração da epidemia (WEBER et al., 1998; MULLINS et al., 2003; STENSBALLE et al., 2003).

Crianças com idade inferior a dois anos são comumente afetadas, podendo apresentar quadros respiratórios obstrutivos com intensidade variada, sendo que as apresentações mais graves ocorrem nos primeiros seis meses de vida, especialmente em prematuros (AMANTÉA e SILVA, 1998; MUCCIOLLO et al, 2008).

1.3.4 Fatores intrínsecos de predisposição à BVA

Lactentes que apresentam condições predisponentes para o desenvolvimento de BVA têm risco aumentado para sua forma mais grave, necessitando de hospitalização, cuidados intensivos e ventilação mecânica. Os principais fatores de risco são a prematuridade, cardiopatia congênita, displasia broncopulmonar e imunodeficiência (WELLIVER, 2003).

Entre lactentes prematuros, as taxas de hospitalização chegam a 9,4%. Nestes casos, a infecção pelo VSR é facilitada pela imaturidade do sistema imunológico, cujas funções quanti e qualitativas diferem significativamente daqueles lactentes a termo. Além disso, há relatos de que entre os prematuros haja a transferência incompleta de anticorpos maternos (WEISMAN, 2003). Alguns estudos indicam que os lactentes com menos de 35 semanas de gestação tem o risco aumentado de hospitalização como resultado da infecção por VSR (WELLIVER, 2003; MEISSNER, 2003).

A presença concomitante de doença pulmonar crônica também aumenta as chances de hospitalização. Por exemplo, quando diagnosticada displasia broncopulmonar antes dos primeiros seis meses de vida, a taxa de hospitalização relacionada ao VSR é de aproximadamente 56%, decaindo para 21% após este período. Alguns estudos sugerem que pacientes com Fibrose Cística também tenham o risco aumentado de internação por infecção viral e pode ocorrer em 4% de todos os lactentes internados por infecção pelo VSR (MEISSNER, 2003; WELLIVER, 2003; PIEDRA, 2003).

A cardiopatia congênita também representa um fator de risco para a doença grave em lactentes infectados por VSR, levando a necessidade de cuidados intensivos, com maiores chances de falência respiratória e morte. Nesses casos, a taxa de hospitalização por BVA entre crianças menores de seis meses chega a 12% e, na segunda metade do primeiro ano, decai a metade. As mortes são mais frequentes entre os pacientes que somam cardiopatia cianótica e hipertensão pulmonar (MEISSNER et al., 2003; WELLIVER, 2003).

Condições associadas a quadros de imunodeficiência em lactentes, tais como câncer, transplantes e a síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) são capazes de dificultar o prognóstico da infecção pelo VSR. Tais pacientes apresentam uma evolução desfavorável da doença, com crepitações aumentadas, exsudato alveolar extenso e pneumonia importante, sendo persistente a replicação viral no trato respiratório (MEISSNER, 2003; WELLIVER, 2003).

Os níveis variados de gravidade da BVA demonstram que há diferentes fatores genéticos e imunológicos envolvidos na resposta de cada indivíduo. Fatores genéticos vêm sendo amplamente associados com a predisposição a infecções pelo VSR. O objetivo de um estudo conduzido por Ciencewicki e colaboradores (2014) foi desenvolver um modelo *in vitro* de infecção por VSR para avaliar a variação interindividual em resposta a este vírus e identificar genes de susceptibilidade. Avaliando linhagens celulares de origem humana de células linfoblastóides, foram capazes de identificar genes de susceptibilidade para a gravidade da doença e que seriam capazes de fornecer informações sobre seu risco em crianças.

Entre os fatores imunológicos, destaca-se o papel das interleucinas (IL), capazes de influenciar diretamente a resposta do paciente ao VSR. Diversos estudos buscam relações entre os polimorfismos em genes envolvidos no sistema imunológico com a predisposição para infecção pelo VSR ou o desenvolvimento de formas mais graves de BVA. Em crianças coreanas, observou-se que a relação entre asma e BVA é modificada pelos polimorfismos nos genes do receptor 4 (TLR4), CD14 e IL-13 (JUNG et al., 2013). Outros estudos relacionaram polimorfismos em IL-10 (KOPONEN et al., 2013), IL-8, IL-13, IL-19, IL-20 (DRYSDALE et al., 2012), TLR2 (NUOLIVIRTA et al., 2013), no receptor de vitamina D (VDR) (STOPPELENBURG et al., 2013; McNALLY et al., 2013).

Portadores da Síndrome de Down também apresentam um risco maior de desenvolver infecção das vias aéreas inferiores com certa gravidade. O fato de

aproximadamente 50% das crianças com esta síndrome apresentarem cardiopatia congênita pode ser um fator importante e condicionante de uma maior necessidade de internação. As anomalias na fisiologia das vias aéreas superiores e a alteração da resposta imune à infecção, associada ao desenvolvimento e função anormal do timo (baixa concentração de células B e T nos primeiros dois anos de vida) também são condições que podem explicar a predisposição destas crianças à doença mais grave, principalmente porque aumentam a propensão à ocorrência de apneia desencadeada por infecções virais (BLOEMERS et al., 2007)

1.3.5 Fatores ambientais de predisposição à BVA

Alguns estudos, ainda, avaliaram a relação entre fatores ambientais com a predisposição para o desenvolvimento de doença respiratória baixa, ou para a forma mais grave de evolução da BVA. Assim, observaram que o risco de hospitalização por BVA está inversamente relacionado com fatores como renda familiar, idade gestacional e tempo de aleitamento materno. Além disso, tal risco estaria diretamente relacionado à aglomerados familiares e exposição passiva a fumaça de cigarros, principalmente em decorrência do tabagismo materno (ALBERNAZ et al., 2003; FERNÁNDEZ et al., 2003).

Crianças cronicamente expostas a fumaça de cigarros parecem ter maior risco de infecção das vias aéreas inferiores e maior probabilidade de sofrer infecções mais graves (NAFSTAD et al., 1996; BACHRACH et al., 2003). Alguns estudos ainda avaliaram a relação do tabagismo passivo com a BVA, sugerindo que a exposição ambiental à fumaça de cigarros também possa ser um fator predisponente para o desenvolvimento de doença respiratória baixa, ou para a forma mais grave da BVA (ALBERNAZ, 2000; HAYES et al, 1989).

Define-se por fumo passivo a inalação da fumaça de derivados do tabaco por indivíduos não fumantes que convivem com fumantes em ambientes fechados. Também se pode considerar fumante passivo o feto que durante a gravidez recebe as substâncias tóxicas que atravessam a barreira placentária ou quando o lactente recebe nicotina através do leite materno (OMS, 2003). Existem mais de 400 substâncias identificadas na fumaça do fumo passivo. Os dois principais componentes da Poluição Tabagística Ambiental são a fumaça exalada pelo fumante (corrente primária) e a fumaça que sai da ponta do cigarro (corrente

secundária), sendo esta última a que contém maior quantidade de substâncias tóxicas (INCA, 2014).

Em consequência disto, marcadores biológicos de exposição a fumo vêm sendo muito utilizados. Aqueles passíveis de determinação são o monóxido de carbono no ar expirado, a carboxihemoglobina, o ticianato, a nicotina e a cotinina. Os três primeiros não são específicos para a fumaça de cigarro, a nicotina tem meia vida apenas de 2 horas e a cotinina é a substância de melhor aplicação para este fim (MARBURY et al., 1993). Entretanto, estas dosagens limitam-se pela capacidade de estimar somente exposições recentes (BENOWITZ, 1999).

Alguns autores, além de questionários aos pais, utilizaram a medição de cotinina urinária nas crianças, encontrando níveis elevados dessa substância naquelas pacientes admitidos no hospital por BVA, quando comparados a pacientes pediátricos admitidas por outras doenças diferente das respiratórias (GURKAN et al, 2000; REESE et al, 1992).

A amamentação parece ter um efeito protetor que se reflete não só na diminuição de risco de infecção, mas também na diminuição do risco de internações (BLACK, 2003; AAP, 2006). O estudo de casos e controles de Victora e colegas (1987) evidenciou maior risco de mortalidade por infecção respiratória em crianças que não haviam sido amamentadas.

Existem também evidências de que o aleitamento diminui a gravidade de doenças respiratórias virais (FRANK et al., 1982). Segundo uma metanálise, o risco de internações por infecções das vias aéreas inferiores em crianças com amamentação exclusiva foi cerca de um terço do risco observado naquelas que recebiam outros tipos de alimentos (BACHRACH et al., 2003). O estudo de Welliver e colegas (1986) ressaltou que crianças amamentadas tiveram risco reduzido de desenvolver BVA. O mesmo efeito protetor foi observado em outro estudo, embora o desfecho fosse infecção respiratória, não separando os casos de pneumonia dos de BVA (PISCANE et al., 1994).

Complementando estes estudos, Albernaz e colaboradores (2003) observaram uma modificação da magnitude do efeito protetor do leite materno entre dois estratos etários. Isso permitiu que os autores concluíssem que o aleitamento materno parece atuar de forma diferente, dependendo da idade da criança; ele exerceria o seu máximo papel protetor quanto mais jovem fosse o bebê.

Crianças que vivem em famílias com baixo nível socioeconômico também tendem a ter infecções com quadros mais severos, o que alguns autores explicam pelo fato destas frequentarem mais creches e, por isso, serem infectadas em idades mais precoces (BLACK, 2003). Em um estudo conduzido por Albernaz e colegas (2003), também se observa que com relação à renda familiar, o risco de hospitalização por BVA mostrou-se quase três vezes maior para o grupo de menor renda. Ao avaliar-se a associação entre escolaridade materna e o desfecho, observou-se um risco duas vezes maior no grupo de mães cuja escolaridade era inferior a cinco anos completos.

1.3.6 Métodos diagnósticos da BVA

Nos últimos anos foram desenvolvidos métodos de diagnóstico direto que permitem detectar a presença de vírus em amostras clínicas. Os métodos laboratoriais mais ágeis e práticos são representados pela imunofluorescência, tanto direta (IFD) como indireta (IFI); o imunoensaio enzimático (ELISA) de similar sensibilidade; o imunofluoroensaio de resolução por tempo (TR-FIA); reação em cadeia da polimerase (PCR) e a transcrição reversa multiplex (RT-PCR), geralmente conduzidas em amostras de aspirado ou lavado nasofaríngeo. Estes métodos podem dar um diagnóstico entre as 4 e 24 horas posteriores à extração da amostra. Assim, o isolamento em culturas celulares mais a identificação por técnicas imunoquímicas é considerado o método de eleição ou padrão para o diagnóstico virológico (WEBER, 1998; WEISSENBACHER et al., 1990; STENSBALLE et al., 2003).

As reações imunológicas utilizadas para diagnóstico envolvem a ligação antígeno-anticorpo que pode ser visualizada ou quantificada por meio de diferentes marcadores. Entre os marcadores mais comumente empregados, podem ser citados os fluorocromos, capazes de absorver radiação (luz ultravioleta - UV), são por ela excitados e emitem luz visível (AOKY et al., 2010). Tanto a IFD quanto a IFI, são técnicas simples que permite a rápida identificação de numerosos vírus. Na prova direta, o soro antiviral específico é marcado com fluoresceína. Na prova indireta, faz-se reagir um soro específico contra o antígeno do vírus a detectar (produzido em animais) e logo se agrega um anticorpo dirigido contra a imunoglobulina da espécie

animal empregada no passo anterior, marcado com fluoresceína (WEISSENBACHER et al., 1990).

Tem sido demonstrado que o VSR é muito lábil e que perde a sua viabilidade durante o processo de transporte. Para superar esta limitação, a coloração por IFD de esfregaços tornou-se um meio padrão de sua detecção. Contudo, este teste é limitado pela subjetiva natureza de leitura do esfregaço corado com marcadores e, assim, pela possibilidade de resultados falso-positivos que ocorrem na fase tardia da doença (JOHNSTON e SIEGEL, 1990).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) coordenou estudos multicêntricos para o desenvolvimento e a utilização de anticorpos monoclonais no diagnóstico de infecções respiratórias virais por IFD ou IFI. Foram realizados ensaios com kits de diagnóstico em 16 laboratórios diferentes que demonstraram sua eficácia (OMS, 1992).

É possível obter os anti-soros específicos, policlonais ou monoclonais, para a identificação da maioria dos vírus respiratórios. Já foi demonstrado que as misturas de anticorpos monoclonais têm alta sensibilidade e especificidade para identificar antígenos virais em amostras clínicas, comparável a qualquer método de referência. Pode-se esperar uma perda mínima de sensibilidade quando são comparados com anticorpos policlonais de alta qualidade, mas os monoclonais permitem uma leitura mais simples e de qualidade muito superior (STOUT et al., 1989; OMS, 1992).

O método de TR-FIA foi desenvolvido para a detecção de vírus respiratórios, permitindo aumentar a sensibilidade da fluorescência ao eliminar a fluorescência inespecífica de fundo e conseguir uma fluorescência de maior intensidade e tempo de queda com o uso de quelato de európio. Sua simplicidade e rapidez derivam do fato de que a amostra é incubada simultaneamente durante apenas uma hora, com o anticorpo de captura e o anticorpo específico marcado com o quelato de európio. O alto custo do equipamento requerido limitou seu uso aos laboratórios de referência (McINTOSH et al., 1993).

Os métodos imunoenzimáticos (ELIZA) para a identificação de vírus respiratórios vêm desempenhando um papel cada vez mais importante no diagnóstico e avaliação epidemiológica de doenças. Simples, e de baixo custo, podem ser tão sensíveis como outras técnicas, pois se constituem na detecção de antígenos em amostras clínicas. Baseiam-se no princípio sanduiche, no qual se colocam as amostras em tubos ou placas que contém anticorpos ligados a uma

superfície de suporte insolúvel, o qual é utilizado para capturar o antígeno específico que se busca na solução de teste. O complexo antígeno-anticorpo é detectado por meio de um outro anticorpo marcado com uma enzima (as mais utilizadas são a peroxidase e a fosfatase alcalina). A atividade enzimática é detectada ao se agregar o substrato, que por uma alteração de coloração da solução, pode ser medida por fotometria e é proporcional à concentração do anticorpo ou antígeno em teste na solução (VOLLER et al., 1976; CHAO et al., 1979; HALSTEAD et al., 1990).

Os anticorpos monoclonais melhoram a sensibilidade e especificidade deste método, podendo, também, ser utilizado para a detecção de anticorpos no soro. Assim, o uso dos testes de ELISA para a detecção direta do antígeno do VSR está cada vez mais prontamente disponível para laboratórios hospitalares e clínicos. Tais ensaios necessitam de apoio laboratorial, mas pouco conhecimento técnico para interpretar e, ainda, podem detectar o antígeno tanto viável quanto inviável (CHAO et al., 1979; HALSTEAD et al., 1990; JOHNSTON e SIEGEL, 1990).

Um estudo conduzido por Johnston e Siegel (1990) com o objetivo de comparar a capacidade de detecção viral em espécimes clínicos de lavado nasofaríngeo, aspirados e swabs, utilizando como métodos de avaliação a cultura celular, ELISA e IFD, concluíram que o método de ELISA forneceu resultados comparáveis aos de IFD, exigindo um tempo semelhante e menos experiência técnica e que o isolamento viral em tubos de cultura teve que ser complementada com a utilização de ELISA e IFD, sugerindo que o uso de um único teste para detectar o VSR é inadequado.

Um enfoque diagnóstico mais recente está dirigido à detecção de genomas virais por hibridação com sondas de ácidos nucléicos específicos para a detecção de vírus. A sonda marcada é aplicada à amostra clínica e, se existir uma cadeia complementar de ácido nucléico viral, ocorre a hibridação que é detectada segundo o sistema de marcação empregado (sondas radioativas ou biotinizadas). Estas sondas podem ser preparadas por diferentes métodos que dependem fundamentalmente do vírus a ser investigado. Nos últimos tempos a tendência tem sido utilizar clones de ácidos nucléicos recombinantes ou oligonucleotídeos sintéticos que representem seqüências específicas do genoma viral de interesse (McIntosh et al., 1993).

A técnica de PCR permite detectar quantidades muito pequenas de vírus, mediante a amplificação de sequencias do genoma viral presente na amostra. O

processo requer o uso de oligonucleotídeos complementares de seqüências genômicas conservadas do vírus denominadas “primers”, de uma enzima DNA polimerase termoestável e de uma transcriptase reversa. Como resultado da reação, são obtidas milhões de cópias a partir de uma única sequência do genoma viral que logo podem ser detectadas a olho nu (por meio do tingimento com brometo de etídio) ou por meio de hibridação (radioativa ou enzimática). Através desta técnica também é possível caracterizar os subtipos do VSR (A e B) (STOCKTON et al., 1998; SYRMIS et al., 2004).

Vários estudos têm mostrado que a PCR pode resolver as limitações inerentes associadas com as técnicas tradicionais de diagnóstico através da combinação de aumento de sensibilidade, especificidade, e rapidez no resultado. No entanto, a PCR pode ser afetada pela presença de variações na sequência que podem ser transformadas em seqüências de ácidos nucleicos altamente conservadas. Além disso, utilizar a tecnologia de PCR convencional para detecção de vários vírus individualmente é caro e de trabalho intensivo. Estas limitações podem ser superadas por meio de um ensaio de PCR multiplex. O formato multiplex é um melhoramento significativo sobre os protocolos de PCR convencionais, obtidos pela incorporação de vários iniciadores que amplificam o DNA ou o RNA de vários vírus de forma simultânea e numa única reação (SYRMIS et al., 2004).

A utilidade da radiografia do tórax para o diagnóstico da BVA vem sendo questionada, já que a maioria dos casos não altera o manejo terapêutico. A taxa de recurso a este exame pode variar entre 20 a 89% nas crianças com BVA, e embora frequentemente (20-96% dos casos) sejam demonstradas alterações radiográficas, não existe evidência suficiente que comprove a eficácia deste exame na distinção entre infecção viral ou bacteriana das vias respiratórias inferiores (BORDLEY et al., 2004; SCHUH et al., 2007).

Na BVA os achados típicos na radiografia do tórax e consistentes com o diagnóstico são o infiltrado pulmonar bilateral ou intersticial difuso, infiltrados peribrônquicos ou para-hilares, com ou sem hiperinsuflação pulmonar ou atelectasia (Schuh et al., 2007). A hiperinsuflação pulmonar é evidenciada pelo aumento da transparência dos campos pulmonares, alargamento dos espaços intercostais e abaixamento do diafragma. Áreas de atelectasia são encontradas mais frequentemente nos lobos superior ou médio do pulmão direito, podendo ser difíceis de diferenciar da consolidação pulmonar (Leung et al., 2005; Schuh et al., 2007).

A principal utilidade da radiografia do tórax consiste na identificação de alterações inconsistentes com a BVA e sugestivas de outro diagnóstico. Garcia e colegas (2004) demonstraram que as crianças com BVA que se apresentaram com temperatura axilar superior a 38°C, saturação de O₂ <94% e classificadas como suscetíveis de necessitar de internamento tinham 2,5 vezes mais probabilidade de apresentar alterações na radiografia do tórax. Em crianças que não apresentem nenhum destes fatores a probabilidade de ter uma radiografia do tórax normal é de 90%, concluindo o autor que não se justifica a sua utilização neste grupo de crianças.

A radiografia do tórax geralmente não é necessária em crianças sem comorbilidades e com doença ligeira a moderada, tratadas em ambulatório, uma vez que não fornece informações capazes de afetar positivamente o tratamento. A realização da radiografia do tórax deve ser considerada nos casos em que o diagnóstico é incerto ou em que a doença tem um curso clínico atípico, particularmente, em crianças com BVA moderado a grave ou hipoxia significativa (AAP, 2006; BORDLEY et al., 2004; GARCIA et al., 2004; SCHUH et al., 2007).

1.3.6.1 Diagnóstico diferencial da BVA

Quando há a suspeita de BVA é importante ter em consideração outras hipóteses de diagnóstico. A asma, por exemplo, é uma das situações clínicas de difícil diferenciação, assim como outras infecções virais. Entretanto, o diagnóstico de BVA pode ser suspeitado pelo quadro clínico, epidemiologia e identificação do agente etiológico ou pela determinação de um aumento do título de anticorpos durante a convalescência (WEBER, 1998; STENSBALLE et al., 2003).

No quadro clínico observa-se dificuldade respiratória e coriza, ausculta pulmonar caracterizada por crepitações e sibilância bilateral (STENSBALLE et al., 2003). Com relação ao diagnóstico laboratorial, antes da década de 80, eram muito utilizados o isolamento viral em cultura de células e a sorologia (STENSBALLE et al., 2003; WEBER, 1998).

Culturas celulares foram usadas extensivamente na detecção de uma variedade de vírus, principalmente os citomegalovírus, o vírus herpes simplex, e da gripe. Embora sejam métodos custosos e relativamente lentos, podendo levar mais de uma semana para o diagnóstico, são capazes de detectar baixas titulações virais,

até mesmo em frações que poderia ser indetectáveis pelos outros ensaios (JOHNSTON e SIEGEL, 1990). A fim de encurtar o tempo de obtenção de resultados da cultura viral, introduziu-se a esta técnica a centrifugação com baixa velocidade das culturas celulares inoculadas com a amostra (WEISSENBACHER et al., 1990).

1.3.7 Tratamento da BVA

O tratamento da BVA tem se modificado durante os anos, mas continua um tema controverso. Não existe tratamento com efetividade demonstrada e, portanto, a estratégia terapêutica empregada não apresenta evidências definitivas para toda a população (CARVALHO et al., 2007). A falta de tratamentos eficazes para a BVA faz da prevenção um alvo particularmente importante na redução do impacto da doença, especialmente em indivíduos em risco (BARALDI et al., 2013; VERMA et al., 2013).

Lactentes com BVA que necessitam hospitalização devem ser continuamente monitorados. O tratamento hospitalar está indicado para crianças com sofrimento respiratório significativo, apresentando dificuldade para alimentar-se, hipoxemia progressiva e possibilidade de fadiga respiratória. Baseia-se na terapia de suporte que pode apresentar uma grande variabilidade entre os centros hospitalares (MUCCIOLLO et al, 2008).

Até o momento, a terapia de suporte com O₂ e hidratação tem sido a principal abordagem recomendada pelas diretrizes internacionais. Além disso, cuidados como um mínimo manuseio da criança, a administração de fluidos para prevenir a desidratação e para manter o equilíbrio térmico, metabólico, hidroeletrolítico e hemodinâmico, orientação aos pais e uma precoce identificação e tratamento das complicações são fundamentais e variam conforme a severidade do quadro clínico infeccioso, enquanto o papel do tratamento farmacológico ainda é debatido e controverso (AMANTÉA e SILVA, 1998; BARALDI et al., 2013; VERMA et al., 2013).

A monitorização cardiorespiratória inclui a oximetria de pulso, devido a natureza obstrutiva da BVA, corrigida com o uso de O₂ suplementar em casos de hipoxemia. Nestes casos, pacientes com SatHb inferior a 92% devem receber o O₂ aquecido e umidificado por cateter nasal, oxitendas ou máscaras. Além disso, as narinas devem ser limpas com solução salina e aspiração de secreções (PANITCH, 2003). O manuseio excessivo pode abalar o equilíbrio clínico na hipoxemia,

principalmente na fase aguda da doença (AMANTÉA e SILVA, 1998; KUSSLER et al., 2001; MEATS-DENNIS, 2005).

Atualmente, não existe um consenso absoluto de tratamento da terapia inalatória, seja quanto aos medicamentos a ser utilizados, seja quanto à frequência de administração (SKJERVEN et al., 2013). Entretanto, evidências preliminares sugerem um potencial favorável na combinação destas terapias com novos tratamentos com a nebulização com solução hipertônica de salina, com adrenalina ou salbutamol associado a mistura de gases com hélio-O₂ (ZORC e HALL, 2010; BRAUN et al., 2010).

A utilização de nebulização com salbutamol, em uma mistura de hélio-O₂ (80:20) foi avaliada em um estudo de coorte. Como resultado os autores puderam verificar que a evolução e o risco de internação em pacientes pediátricos com diagnósticos de crise de asma ou BVA foi significativamente modificada. Constatou-se que a mistura hélio-O₂ para administração de salbutamol, é efetivo no tratamento da doença obstrutiva infantil com resposta à terapêutica broncodilatadora e, quando comparado à técnica usual de nebulização, está associado à menor permanência em sala de observação após 6 horas de tratamento (BRAUN et al., 2010).

A nebulização com solução hipertônica de salina é capaz de diminuir o edema e o entupimento por muco, características patológicas predominantes e relacionadas a obstrução das vias aéreas de crianças com BVA. Um levantamento recente colheu dados de diversos estudos sobre este assunto e, assim, foi capaz de propor que a nebulização de salina a 3% pode reduzir significativamente o tempo de hospitalização entre as crianças com BVA e melhorar os escores de severidade clínica (ZANG et al., 2013).

O aporte líquido adequado torna-se importante já que alguns lactentes tendem a apresentar algum grau de desidratação em função do aumento no gasto hídrico, causado pela presença de quadros febris ou de taquipnéia, e redução da ingestão em decorrência de dificuldades em sugar e alimentar-se espontaneamente (AMANTÉA e SILVA, 1998; PANITCH, 2003).

Assim, a administração parenteral de líquidos frequentemente é necessária. Ela deve ser indicada apenas em pacientes com frequências respiratórias superiores a 60 mrm, com suspensão da alimentação oral pelo risco de vômitos e aspiração, além da necessidade de ser monitorada devido ao risco de sobrecarga hídrica e congestão pulmonar (KHOSHOO e EDELL, 1999; PANITCH, 2003).

A orientação aos pais com relação aos cuidados a serem tomados para evitar uma reinternação da criança acometida por BVA perpassam assuntos como a higienização das mãos, a não exposição da criança a fumaça de cigarros e locais com aglomerações de pessoas, além de evitar o compartilhamento de chupetas e brinquedos. Também se fazem importantes as orientações sobre os cuidados na administração dos medicamentos indicados e o reconhecimento de sinais e sintomas que incluem angústia respiratória, febre recorrente, redução do apetite e desidratação, os quais conduzem a necessidade de uma avaliação profissional (BANDEIRA et al., 2005).

Alguns tratamentos, apesar de serem contraindicados, controversos ou apresentarem falta de comprovação quanto à sua eficácia, são bastante utilizados, como o uso de broncodilatadores (BD), corticosteroides, antibióticos, ribavirina, surfactante, inalação com adrenalina, assim como a indicação de fisioterapia. Infelizmente, tais tratamentos têm mostrado pouco ou nenhum efeito sobre o quadro respiratório (MARTINÓN-TORRES et al., 2001; KIMPEN, 2002; STEINER, 2004; MUCCIOLLO et al., 2008).

A indicação de uso de BD é empírica. Especialmente nos primeiros dois anos de vida, seu uso pode reduzir parcialmente os sintomas obstrutivos. Quando usados, prefere-se os β 2-adrenérgicos de curta ação, por via inalatória, através de aerossóis dosimetrados com espaçadores apropriados para a idade. Estudos que avaliaram momentos pré e pós a administração de BD, em lactentes e crianças portadoras de BVA, mostram resposta variável, mas na maioria dos pacientes, não se observa resposta imediata. Contudo seu uso deve ser guiado por critérios clínicos (CHANG et al., 1998; TEPPER et al., 1999; KIM et al., 2001; TEPPER et al., 2002; ROSA e COSTA, 2011).

Glicocorticóides também foram testados para o tratamento de BVA. A justificativa para sua utilização está relacionada a inflamação na gênese do processo, evidenciada pelo aumento na liberação de mediadores do processo inflamatório e em achados anátomo-patológicos (AMANTÉA e SILVA, 1998; ROSA e COSTA, 2011).

Estudo clínico randomizado concluiu que os benefícios alcançados com a terapia com corticoides sistêmicos dependem da gravidade da BVA e do tempo de tratamento e, que, em longo prazo, crianças predispostas à asma que tiveram BVA podem se beneficiar (GARRISON et al., 2003). Outro estudo, mais recente, concluiu