

---

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

**CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DO ESCARRO  
INDUZIDO EM CRIANÇAS COM ASMA ATÓPICA E  
NÃO-ATÓPICA NO SUL DO BRASIL**

Anna Cláudia Drews

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade  
de Medicina da PUCRS para obtenção de título de  
Mestre em Medicina/Pediatria.

Orientador: Dr Renato Tetelbom Stein

Porto Alegre, janeiro de 2007

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

D776c Drews, Anna Cláudia

Características citológicas do escarro induzido em crianças com asma atópica e não-atópica no Sul do Brasil / Anna Cláudia Drews; orient. Renato Tetelbom Stein. Porto Alegre: PUCRS; 2007.

121f.: gráf. tab.

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

1. ASMA. 2. CRIANÇA. 3. ESCARRO/citologia. 4. SONS RESPIRATÓRIOS. 5. BRONQUIOLITE. 6. BRONQUITE. 7. FENÓTIPO. 8. ESTUDOS DE CASOS E CONTRÔLES. 9. ESTUDOS TRANSVERSAIS. 10. HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA. I. Stein, Renato Tetelbom. II. Título.

C.D.D.616.23

C.D.U. 616.24-008.8-053.2(043.3)

N.L.M. QY 120

**Mestranda: Anna Cláudia Drews**

Endereço: Armando Odebrecht 70, sala 710 – Garcia – Blumenau – SC – 88320 - 000

Fone: (47) 9193-9290 / (47) 3322-6838/ (47) 3387-0023

e-mail: [annadrews@hotmail.com](mailto:annadrews@hotmail.com) / [annadrews@pneumoped.com.br](mailto:annadrews@pneumoped.com.br)

CREMERS: 25411

CREMESC: 12256

Órgão financiador: CAPES

Conflito de interesses: nenhum

---

*“Enquanto houver mãos humanas administrando as engrenagens da vida, o tempo não esmagará ninguém”*

*(Charles Chaplin)*

---

*Dedicatória*

*Aos meus pais e a meu irmão, por tudo.*

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Renato Tetelbom Stein, pela confiança, inteligência e infinita competência na arte de ensinar a Pneumologia Pediátrica.

Ao Prof Dr Paulo Márcio Condessa Pitrez, pelo estímulo e alegria, essenciais na minha formação.

À Dra Marilyn Urrutia Pereira, exemplo de força e de perseverança, por toda a ajuda proferida.

Aos Drs Emílio Pizzichini e Márcia Margareth Menezes Pizzichini e toda sua equipe, pelo treinamento da indução e processamento do escarro e pela ajuda na análise dos dados.

A Daniela Benzano, pela ajuda na análise estatística.

Ao Dr Emerson Rodrigues da Silva, por sua grande responsabilidade no exercício da Medicina e pela colaboração para a elaboração do trabalho.

À bolsista de iniciação científica Daniele Escouto, por sua incansável disponibilidade e enorme competência, por demais importantes na trajetória de um pesquisador. E acima de tudo isso, parabéns pela incomparável eficiência!

À bioquímica Ana Christina de Oliveira Dias, pela análise das lâminas, praticidade e agilidade. Sua ajuda foi essencial!

---

Aos bolsistas de iniciação científica Gustavo Leivas e Laura Massuco, por sua força de vontade e auxílio no trabalho de campo.

A toda a equipe do Laboratório Biosul de Uruguaiana-RS, pela hospitalidade e pela viabilização do local para a coleta de dados.

À cidade de Uruguaiana, às crianças e a seus pais, que em nós confiaram e possibilitaram a realização deste trabalho.

À Carla, de Uruguaiana-RS, por sua eficiência na coleta dos questionários e no recrutamento das crianças.

Para a secretária da pós-graduação e grande amiga, Carla Rothmann, por seu empenho na organização do curso e pela ajuda no decorrer da minha formação.

Aos queridos Ilka Cosner Schmitt e Guilherme Bivar Cosner Schmitt, por todo o carinho recebido e pela convivência mais que agradável.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela disponibilização da bolsa de pesquisa.

Aos meus colegas e professores, por todo o aprendizado recebido durante o desenvolvimento do meu mestrado.

A todos meus amigos, em especial Marcelle Ferraz, Aline Ranzolin, Luciana Perez e Giovana Santos. Não há palavras para agradecer pelo ombro amigo nos momentos difíceis, decisivos e marcantes de minha vida.

---

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvi</b>

## CAPÍTULO I

<b>1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Introdução.....	3
1.1.2 Histórico e utilidade do escarro induzido na prática clínica .....	6
1.1.2.1 Inflamação de via aérea inferior e fenótipos de asma.....	8
1.1.2.2 Estudos com escarro induzido no Brasil .....	10
1.1.3 Considerações metodológicas da técnica de indução do escarro através de nebulizações com solução salina hipertônica.....	11
1.1.4 Comparação entre amostras obtidas por escarro induzido e por lavado broncoalveolar .....	17
1.1.5 Comparação entre amostras obtidas por escarro espontâneo e por escarro induzido .....	18
1.1.6 Uso do EI no estudo da asma .....	18
<b>1.2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>

---

---

1.3.1 Objetivo Geral .....	22
1.3.2 Objetivo Específico .....	22
<b>1.4 HIPÓTESES.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>

## CAPÍTULO II

<b>2.1 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
2.1.1 Delineamento .....	35
2.1.2 Local .....	35
2.1.3 População e amostra .....	35
2.1.3.1 Tamanho da amostra. ....	36
2.1.4 Critérios de inclusão .....	37
2.1.5 Critérios de exclusão .....	37
2.1.6 Descrição dos procedimentos .....	38
2.1.6.1 Termo de consentimento .....	39
2.1.6.2 Aplicação do questionário.....	39
2.1.6.3 Teste cutâneos .....	40
2.1.6.4 Indução de escarro.....	42
2.1.6.5 Processamento da amostra .....	46
2.1.6.6 Exame citológico diferencial.....	49
<b>2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>51</b>
<b>2.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>2.4 REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>

---

---

### CAPÍTULO III

<b>ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>60</b>
-----------------------------	-----------

### CAPÍTULO IV

<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
-------------------------	-----------

### CAPÍTULO V

<b>ARTIGO DE REVISÃO SOBRE ESCARRO INDUZIDO .....</b>	<b>94</b>
---	-----------

### ANEXOS

<b>Anexo 1 - Termo de Consetimento Livre e Esclarecido (Adendo, utilizado para o estudo atual) .....</b>	<b>115</b>
<b>Anexo 2 - Termo de Consetimento Livre e Esclarecido – Dissertação Dra. Marilyn Urrutia Pereira.....</b>	<b>117</b>
<b>Anexo 3 - Questionário.....</b>	<b>119</b>
<b>Anexo 4 - Ficha de dados do paciente .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>i</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1- Concentração de eosinófilos, expressa em mediana .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 2- Eosinofilia no escarro induzido.....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 3-Concentração de neutrófilos, expressa em mediana.....</b>	<b>77</b>

---

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela1- Características demográficas e fenotípicas da amostra estudada (n=55) .....</b>	<b>72</b>
<b>Tabela 2- Função Pulmonar, em percentual do valor previsto .....</b>	<b>73</b>
<b>Tabela 3- Características citológicas do escarro induzido, expressas em mediana e intervalo interquartil, valor mínimo e valor máximo .....</b>	<b>74</b>

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	asma atópica/ <i>atopic asthma</i>
<b>AD</b>	água destilada
<b>ANA</b>	asma não-atópica
<b>ATS</b>	<i>American Thoracic Society</i>
<b>C1</b>	dezena do TCC ( $C1 \times 10^6/ml$ )
<b>CVF</b>	capacidade vital forçada
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EI</b>	escarro induzido
<b>IgE</b>	imunoglobulina E
<b>ISAAC</b>	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
<b>LBA</b>	lavado broncoalveolar
<b>MGG</b>	May-Grumwald-Giemsa
<b>NAA</b>	<i>non-atopic asthma</i>
<b>NANA</b>	não-asmático, não-atópico, grupo-controle/ <i>non-asthmatic, non-atopic, control group</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>Rpm</b>	rotações por minuto

---

<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>TCC</b>	contagem total de células
<b>V1</b>	volume filtrado
<b>V2</b>	volume de PBS acrescentado ao precipitado
<b>VEF1</b>	volume expiratório forçado em um segundo

---

## RESUMO

**Introdução:** O escarro induzido (EI) é um método não-invasivo útil para avaliar a inflamação de vias aéreas inferiores, característica principal observada na asma. Sabe-se que em adultos a inflamação do tipo eosinofílica é a mais comumente encontrada, pois a maioria desses pacientes apresenta alergia como característica associada. Em crianças, observa-se um número significativo de asmáticos com características não-alérgicas e nestes casos ainda não está bem definido qual o padrão inflamatório predominante. Há poucos estudos comparando a inflamação brônquica entre estes diferentes fenótipos de asma. Nosso estudo teve como objetivo avaliar características citológicas do EI em crianças com asma atópica e não-atópica, comparando-as a um grupo controle sadio.

**Métodos:** Dentre crianças que participaram da fase II do estudo ISAAC no sul do Brasil, que tinham respondido ao questionário de doenças respiratórias e haviam sido submetidas a testes cutâneos para alérgenos ambientais comuns, uma sub-amostra aleatória foi selecionada. Assim definiram-se grupos representando dois fenótipos clínicos de asma e um grupo controle de normais, a saber: asma atópica (AA), asma não-atópica (ANA) e controles não-asmáticos/não-atópicos (NANA). Todas estas crianças tiveram escarro induzido através de solução salina a 4.5% e as características citológicas foram comparadas entre os três grupos.

**Resultados:** Noventa crianças foram selecionadas a participar do estudo, sendo incluídas setenta e seis crianças (28 AA, 29 ANA e 19 NANA), com média de idade de 13 (0.97) anos. O escarro foi induzido com sucesso em 55 (72.3%) crianças (21 AA, 21 ANA e 13 NANA). Os dados demográficos e a média do VEF1 foram similares nos três grupos. A mediana (intervalo interquartil) da proporção de eosinófilos foi significativamente superior no escarro dos AA [9 (14)], comparado aos ANA [1 (2)] e aos NANA [0.5 (1)],  $p < 0,001$ . A proporção de crianças com eosinofilia no escarro (eos  $\geq 3\%$ ) foi também significativamente maior nos AA (81%) que nos ANA (23.9%), e não houve nenhum caso entre os NANA ( $p < 0,001$ ). A mediana (intervalo interquartil) da contagem de neutrófilos foi significativamente maior no escarro dos ANA [18 (5.6)], comparado aos AA [11 (2)] e aos NANA [(13 (7)),  $p < 0,001$ .

**Conclusões:** Os resultados indicam que uma inflamação eosinofílica, assim como ocorre em pacientes adultos, pode ser detectada desde a pré-adolescência em crianças com asma atópica. Por outro lado, asmáticos não-atópicos não apresentam este perfil de resposta inflamatória, sendo neste grupo evidenciada uma maior proporção de neutrófilos.

**Palavras-chave:** Escarro Induzido; Solução Salina Hipertônica; Células Inflamatórias; Asma; Criança; Fenótipos de Asma; Inflamação de Vias aéreas.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Induced sputum (IS) is a useful non-invasive method to evaluate lower airway inflammation, the principal characteristic observed in asthmatic subjects. Asthma in adult patients is most times associated with allergy and these patients present eosinophilic inflammation in the airways as its main feature. Most children with asthma present non-allergic disease, and it is still not well defined which is the predominant inflammatory profile in these cases. There are few studies comparing bronchial inflammation in these different asthma phenotypes. The aim of this study was to evaluate the cytological profile of IS in children with atopic and non-atopic asthma, compared with a healthy control group.

**Methods:** Of children who participated in the ISAAC-Phase II study in Southern Brazil, had completed the respiratory disease questionnaire and had done skin prick tests for common allergens, a sub-group was alleatory selected. They represented two asthma phenotypes and a healthy control group, known as: atopic asthma (AA), non-atopic asthma (NAA), and non asthmatics/non-atopic (NANA, control group). Sputum was induced with 4.5% hypertonic saline solution for all participating children; cytology profiles were compared among these the three groups.

**Results:** Ninety children were selected to participate in this study and 76 children were included (28 AA, 29 NAA, and 19 NANA), with mean age of 13 (0.97) years. Sputum was successfully induced in 55 (72.3%) children (21 AA, 21 NAA, and 13 NANA). Demographic data and VEF1 mean were similar in the three groups. The median eosinophil (interquartile range) proportion was significantly higher in the sputum of AA [9 (14)], compared with both NAA [1 (2)], and NANA [0.5 (1)],  $p < 0.001$ . The proportion of children with sputum eosinophilia (eos  $\geq 3\%$ ) was also significantly higher among the AA (81%), compared with the NAA (23.8%) and the NANA (without any) ( $p < 0.001$ ). The median neutrophil (interquartil range) was significantly higher in the sputum of NAA [18 (5.6)], compared with AA [11 (2)], and NANA [13 (7)],  $p < 0.001$ .

**Conclusions:** The results suggest that airway eosinophilia, as observed in adults, can be detected since pre-adolescence in children with atopic asthma. Children with non-atopic asthma did not present this inflammatory profile. In this group a higher proportion of neutrophil was observed.

**Key words:** Induced Sputum; Hypertonic Saline Solution; Inflammatory cells; Asthma; Children; Asthma Phenotypes; Airway Inflammation.

---

---

# CAPÍTULO I

---

---

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

**1.1 REFERENCIAL TEÓRICO**

**1.2 JUSTIFICATIVA**

**1.3 OBJETIVOS**

**1.4 HIPÓTESES**

**1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## **1.1 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1.1 Introdução**

A asma é uma doença caracterizada por uma inflamação crônica associada a hiper-responsividade das vias aéreas inferiores e limitação variável ao fluxo aéreo.<sup>1</sup> É uma das doenças respiratórias mais comuns no mundo, com uma prevalência que vem aumentando nas últimas décadas em 1,5 a 3 vezes.<sup>2,3</sup>

Nos países em desenvolvimento, é responsável por 5 a 10 % das mortes por causas respiratórias, com alta proporção de óbitos domiciliares e no Brasil corresponde a cerca de 350.000 internações ao ano.<sup>4</sup> Em Porto Alegre, segundo dados do estudo ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood), a prevalência cumulativa de asma entre crianças de 13 a 14 anos é de 21,9%.<sup>5</sup>

Muitos fatores influenciam na fisiopatogenia da asma. Fatores como herança genética, atopia, idade, gênero, características socio-econômicas e ambientais agem conjuntamente, reafirmando o caráter multifatorial dessa doença e contribuindo para a

---

---

identificação de diferentes fenótipos e manifestações clínicas da asma.<sup>6,7</sup> A atopia, apesar de ser considerada por grande parte de pesquisadores um importante determinante de asma, não está presente em todos os casos da doença. Fenótipos de asma não-atópica já foram identificados e parecem ser tão comuns quanto a asma atópica.<sup>7,8</sup>

O caráter multifatorial da asma torna mais difícil o seu adequado entendimento. Numerosos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar a relação entre os diferentes fatores de risco e os fenótipos da asma, tentando também explicar as diferenças nas prevalências entre populações de países distintos e de um mesmo país.<sup>5,7-19</sup>

Observou-se que em todos os fenótipos de asma e independente dos fatores de risco envolvidos, ocorre uma inflamação crônica da mucosa brônquica, seguida por obstrução ao fluxo aéreo.<sup>20,21</sup> Esta inflamação está presente em todos os tipos da doença, inclusive nos quadros mais leves e algumas vezes naqueles estáveis, com função pulmonar normal e sem sintomas atuais da doença.<sup>20</sup> Há relatos de uma inflamação eosinofílica mesmo em pacientes com asma controlada.<sup>22</sup>

Isto sugere que a avaliação da função pulmonar associada às manifestações clínicas de asma (rotineiramente utilizada na prática médica e recomendada pelos consensos no manejo de doenças respiratórias)<sup>23,24</sup> talvez não seja suficiente para predizer um adequado controle da doença.<sup>20</sup> Por outro lado, a avaliação dessas medidas junto com a monitorização da inflamação brônquica pode contribuir para um melhor controle da doença.<sup>25-28</sup>

A referida associação entre inflamação crônica de vias aéreas inferiores e asma fez com que avaliação dos padrões inflamatórios e sua relação com manifestações

---

clínicas da doença começassem a despertar o interesse da comunidade científica.<sup>29-32</sup> Inicialmente a coleta de células da mucosa brônquica para avaliação de atividade inflamatória era feita através da biópsia pulmonar.<sup>30,33</sup> Porém a realização da biópsia era pouco viável, por ser um procedimento cirúrgico, invasivo e passível de complicações.

Havia a necessidade de se determinar um método menos invasivo e mais seguro para fornecer dados de inflamação brônquica. Estudos com biópsia pulmonar demonstraram que características clínicas (melhora dos sintomas, por exemplo) ou de função pulmonar (como variabilidade do pico de fluxo expiratório ou grau de responsividade brônquica) não apresentam correlação significativa com alterações histológicas. Logo, estes fatores não poderiam ser utilizados como marcadores indiretos de inflamação de via aérea.<sup>33</sup>

A broncoscopia com lavado broncoalveolar (LBA) surgiu como alternativa à biópsia pulmonar, não necessitando de intervenção cirúrgica.<sup>30</sup> Entretanto, ainda continuava sendo um método invasivo com necessidade de anestesia, e a coleta de amostras repetidas em um mesmo paciente (necessária para monitorizar a evolução da inflamação brônquica) permanecia pouco viável eticamente.<sup>33</sup>

Foi nos anos noventa que o estudo do processo inflamatório de vias aéreas inferiores se tornou viável por meio de uma técnica não-invasiva, sem a necessidade de anestésias ou procedimentos cirúrgicos.<sup>34</sup> Esta técnica utiliza-se da indução de escarro por meio de nebulizações com solução salina hipertônica, conhecida como escarro induzido (EI), e tem se mostrado um método acurado, de baixo custo e seguro, inclusive em pacientes com asma grave.<sup>20, 32- 40,</sup>

---

### **1.1.2 Histórico e utilidade do escarro induzido na prática clínica**

O EI foi inicialmente utilizado em 1958 por Bickerman e colaboradores<sup>41</sup> para investigar câncer de pulmão. Mas apenas na última década foi reconhecido como uma alternativa não-invasiva e segura para fornecer amostras de vias aéreas inferiores em pacientes asmáticos,<sup>34</sup> viabilizando o surgimento de um número crescente de estudos na área de inflamação brônquica.<sup>29 - 40, 42 - 44</sup>

A avaliação da resposta inflamatória de vias aéreas inferiores por meio do EI possibilitou avanços na compreensão da fisiopatogenia da asma, sendo útil no diagnóstico e também na decisão de condutas terapêuticas.<sup>26</sup>

Já se sabe que na “asma clássica” (associada a atopia) existe um aumento da proporção de eosinófilos na mucosa brônquica, com níveis superiores a 3%,<sup>35</sup> e que o uso de corticóides pode diminuir esta concentração.<sup>45,46</sup> A monitorização da proporção de eosinófilos no EI pode ser útil para predizer resposta ao tratamento com corticóides inalados e também ajuda na diminuição da dose utilizada e na suspensão dos mesmos.<sup>47,48</sup> Foi observada uma pobre resposta à terapia com corticóides em pacientes com concentrações de eosinófilos inferiores a 3%, o que pode servir de base literária para evitar o uso de doses altas destes medicamentos neste grupo de pacientes.<sup>42</sup> Por outro lado, pacientes com concentrações de eosinófilos superiores a 3% (concentração esta comumente considerada como uma eosinofilia no escarro), apresentam uma resposta favorável à corticoterapia.<sup>49</sup> A dose de corticóide deve ser regulada com o

---

objetivo de manter concentrações de eosinófilos inferiores a 3%, podendo a dose ser diminuída e até suspensa quando as concentrações caem abaixo desse nível.<sup>47 - 49</sup>

Além do auxílio na decisão da dose de corticóide a ser utilizada, estudos sugerem que a monitorização da concentração de eosinófilos no escarro associada ao uso de uma terapia que objetive a manutenção de níveis normais de eosinófilos, poderia estabilizar o paciente e diminuir o risco de exacerbações da doença. Estes estudos baseam-se na evidência de que a concentração de eosinófilos no escarro aumenta antes mesmo de surgirem os sintomas de uma exacerbação da asma.<sup>25 - 28</sup>

Um estudo randomizado, placebo controlado<sup>25</sup> dividiu 74 pacientes em dois grupos: um com tratamento objetivando a normalização da concentração de eosinófilos no EI. O segundo grupo recebia o tratamento convencional.<sup>24</sup> A frequência de exacerbações de asma nos pacientes do primeiro grupo foi significativamente menor (35 exacerbações versus 109,  $p=0,01$ ), assim como foi observado na taxa de hospitalizações (1 versus 6,  $p=0,047$ ). Este estudo mostrou também que a inclusão do EI no manejo da asma é custo-efetiva, considerando a diminuição de gastos com o tratamento das exacerbações da asma.<sup>25</sup>

Outra contribuição da avaliação da inflamação brônquica através do EI consiste na identificação de um aumento da concentração de neutrófilos em pacientes em exacerbação de asma ou com asma grave.<sup>49, 52, 53</sup> Além disso, tem sido descritos fenótipos de asma não relacionados com eosinofilia.

---

### **1.1.2.1 Inflamação de via aérea inferior e fenótipos de asma**

A asma era classicamente descrita como uma doença caracterizada por atopia e maiores concentrações de eosinófilos no escarro. Entretanto, a avaliação da resposta inflamatória brônquica e o grande número de estudos epidemiológicos desenvolvidos nos últimos anos têm ajudado na identificação de diferentes fenótipos de asma. Existem fenótipos de asma atópica e não-atópica. No último caso, não ocorre associação com alergia e parece haver uma menor proporção de pacientes com inflamação eosinofílica.<sup>50,54,55</sup> Especula-se que pacientes com asma não-eosinofílica tenham uma maior ativação de neutrófilos no escarro.<sup>56</sup>

Há evidências cada vez maiores de que a inflamação não-eosinofílica seja tão comum quanto a eosinofílica. Em revisão realizada por Dowes e colaboradores, apenas 50% dos casos de asma foi atribuído a uma inflamação eosinofílica. Nos demais casos uma inflamação neutrofílica se mostrou presente, tanto em pacientes com asma grave quanto naqueles com asma leve e moderada.<sup>55</sup> Em uma outra revisão, publicada em 2006, o fenótipo de asma não-eosinofílica pôde ser identificado entre 25 a 55% dos asmáticos virgens de tratamentos com corticóides.<sup>57</sup>

A constatação de que a asma não-eosinofílica é de prevalência igualável à eosinofílica ressalta a necessidade de um melhor entendimento da doença. É consenso que características genéticas, socio-econômicas e ambientais (como influência de infecções virais, bacterianas, parasitárias e de alérgenos) agem em conjunto na fisiopatogenia da asma,<sup>7, 12-16</sup> gerando fenótipos relacionados ou não à alergia.<sup>7,54,55</sup>

---

Em crianças, três fenótipos de asma já foram bem descritos, baseando-se em dados clínico-epidemiológicos. São eles a sibilância transitória, sibilância não-atópica da criança e de pré-escolares e sibilância atópica mediada por IgE.<sup>7</sup> Os fenótipos de sibilância transitória e de sibilância não-atópica da criança e de pré-escolares não apresentam associação com alergia. Neste último, o fator de risco principal parece ser a exposição a infecções virais de via aérea inferior (especialmente pelo vírus sincicial respiratório e se antes dos três anos de vida), ocorrendo inflamação da mucosa brônquica, perda da função da função pulmonar e sibilância. Já no fenótipo de sibilância atópica mediada por IgE, conhecido como “asma clássica”, ocorre sensibilização a alérgenos e diferenciação dos linfócitos em células Th2 (associadas a atopia).<sup>7</sup>

Na asma atópica existe comumente o relato de história materna de asma, hospitalizações por bronquillite, melhor escolaridade materna, além de serem essas crianças moradoras de áreas melhor urbanizadas. Na asma não-atópica também é observada uma história de internação por bronquiolite e história materna de asma, mas neste fenótipo parece existir uma maior proporção de moradores de uma área mais pobre (menos urbanizada), além de apresentarem uma maior exposição a infecções virais, o que parece estar diretamente relacionado com o número de irmãos que habitam na mesma casa. Outro fator que parece estar associado ao fenótipo de asma não-atópica é a exposição passiva ao tabaco, expressa pela coabitação com pais fumantes.<sup>58</sup> Apesar de bem descritas as diferenças clínico-epidemiológicas entre esses fenótipos de asma, ainda não há relatos do padrão inflamatório da mucosa brônquica nestes grupos de crianças.

### **1.1.2.2 Estudos com escarro induzido no Brasil**

Palomino e colaboradores publicaram em maio de 2005 um estudo descrevendo a utilização do escarro induzido em crianças e adolescentes com asma.<sup>53</sup> Foram incluídos 96 pacientes de 6 a 18 anos de idade (estáveis ou em exacerbação de asma), acompanhados nos ambulatórios de Pneumologia e de Imunologia do Instituto da Criança do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O exame se mostrou seguro (inclusive nos pacientes em exacerbação de asma), com taxa de sucesso de 67% (o grupo de estudo constituiu-se portanto de 68 pacientes).

Os achados citológicos foram comparados entre quatro grupos (asma leve, moderada, grave e exacerbação de asma), não sendo encontrada diferença na quantificação de eosinófilos. Nos pacientes em exacerbação de asma houve predomínio de neutrófilos, quando comparados aos outros grupos ( $p < 0,05$ ).<sup>53</sup> Este estudo é de grande valia, uma vez que é um dos pioneiros a utilizar EI em crianças brasileiras. Entretanto, não analisou a relação entre os achados citológicos da inflamação brônquica com diferentes fenótipos de asma. Além disso, foram incluídas crianças que recebiam corticoterapia, o que sabidamente altera a concentração de eosinófilos no escarro e pode ter interferido nos resultados encontrados.

Mais estudos se fazem necessários em todo o mundo e principalmente na população brasileira. O aperfeiçoamento da técnica do EI nos últimos anos torna possível essa investigação adicional e nos possibilita ampliar a linha de pesquisa em crianças, estudando inclusive a relação entre os padrões de inflamação brônquica e os

---

---

fenótipos de asma na infância. Para maiores esclarecimentos quanto ao EI, seguem abaixo algumas considerações metodológicas.

### **1.1.3 Considerações metodológicas da técnica de indução do escarro através de nebulizações com solução salina hipertônica**

#### Tipo de Nebulizador

Em crianças, o EI foi inicialmente realizado com nebulizadores de baixo fluxo (fluxos inferiores a 1 ml/min) ou com nebulizadores a jato.<sup>34</sup> A taxa de sucesso era em torno de 76%.<sup>21</sup> O aperfeiçoamento da técnica com o uso de nebulizadores ultrassônicos contribuiu para um aumento na taxa de sucesso da indução,<sup>21,44,59,60</sup> chegando a índices de 92%.<sup>29,44</sup> Graças a isto, estes nebulizadores são hoje os mais empregados<sup>59</sup>

#### Concentração de solução salina

Outro fator importante reside na utilização de concentrações de solução salina de acordo com protocolos validados. As nebulizações podem ser realizadas com concentrações crescentes (iniciando-se em 3%, sendo progressivamente aumentadas até 5%),<sup>34,59,61</sup> ou com uma mesma concentração durante todo o período de indução.<sup>44,62</sup> Neste

---

---

caso, a concentração de 4.5% é das mais utilizadas por ser efetiva, geralmente bem tolerada e disponível comercialmente. As outras concentrações necessitam de manipulação por parte dos pesquisadores.<sup>62</sup>

Soluções salinas isotônicas (0.9%) também podem ser utilizadas, especialmente nos pacientes em exacerbação de asma ou naqueles com asma grave que não toleram nebulizações com soluções hipertônicas.<sup>63</sup>

Não foi observada diferença na composição celular das amostras de escarro obtidas com solução salina isotônica ou hipertônica. Entretanto, a taxa de sucesso da indução é superior quando se utilizam soluções hipertônicas, independente de terem sido utilizadas concentrações crescentes de solução salina ou uma mesma concentração em todos os períodos de nebulização.<sup>59</sup> De modo geral, se o paciente não apresentar asma grave e não estiver em exacerbação da doença, utilizam-se nebulizações com soluções hipertônicas. Nos pacientes com asma grave, inicia-se a indução com soluções isotônicas.<sup>59</sup>

### Espirometrias

Durante todo o processo do EI devem ser realizadas curvas espirométricas para a obtenção de medidas do volume expiratório forçado em um segundo (VEF1). Pacientes com VEF1 inferior a 75% do valor previsto<sup>23,64</sup> não devem ser submetidos ao EI com soluções hipertônicas, uma vez que estas soluções são agentes broncoprovocadores da

---

via aérea.<sup>34</sup> Uma alternativa neste grupo de pacientes é a indução de escarro com soluções isotônicas.<sup>59,63</sup>

A medida do VEF1 é também utilizada como valor de alerta durante a indução do escarro. Espirometrias são repetidas entre cada período de nebulização com solução salina e se em algum momento o VEF1 cair abaixo de 20% do valor basal (alguns protocolos aceitam uma queda de no máximo 15%), deve-se interromper a indução, administrar um broncodilatador e prosseguir o exame apenas no caso de retorno do VEF1 a pelo menos 90% do seu valor basal.<sup>21,34,62</sup>

### Broncodilatadores

Além do tipo de nebulizador e da concentração de solução salina utilizados, pode-se optar pelo uso de broncodilatadores antes ou apenas depois do início da indução.

O emprego de broncodilatadores (como o salbutamol) antes do início da indução de escarro é útil na prevenção de uma broncoconstrição secundária à solução salina hipertônica e auxilia na obtenção de amostras mais adequadas de escarro, sendo este o método mais recomendado pela literatura.<sup>34,44,62</sup>

Por outro lado, quando se opta por não usar broncodilatadores antes de iniciar a indução de escarro, existe a vantagem de uma avaliação de forma simultânea da inflamação e da hiperresponsividade de vias aéreas.<sup>44</sup> A solução salina hipertônica serve como um agente broncoprovoador.<sup>65</sup> Não sendo administrado salbutamol spray antes do

---

início da indução, pode ocorrer broncoconstrição, o que indicaria hiperresponsividade de vias aéreas e seria um dado adjuvante no diagnóstico da asma.<sup>65</sup> Nesta técnica o broncodilatador é utilizado apenas no caso de piora clínica ou da função pulmonar.<sup>44</sup>

Jones e colaboradores publicaram um estudo comparando as técnicas de indução de escarro com e sem inalação prévia de salbutamol.<sup>44</sup> A taxa de sucesso da indução, com obtenção de uma amostra adequada de escarro, foi de 92% no grupo com inalação prévia de broncodilatador e de 70% no grupo submetido à técnica associada à broncoprovocação ( $p = 0,03$ ), sendo a indução melhor tolerada na técnica com inalação prévia de broncodilatador. O efeito colateral mais comumente observado foi tosse e esta ocorreu em apenas 4% dos pacientes submetidos à técnica com inalação prévia de broncodilatador. Já na técnica concomitante à broncoprovocação, a tosse foi observada em 13% dos pacientes ( $p = 0,0005$ ).<sup>44</sup>

#### Tempo total de nebulização com solução salina hipertônica

A variação no tempo de nebulização pode alterar a contagem diferencial de células.<sup>44,62</sup> Nebulizações por períodos mais longos fornecem amostras de escarro de vias aéreas mais inferiores, resultando em menos neutrófilos e eosinófilos e mais macrófagos. Nebulizações por períodos mais curtos viabilizam escarro de vias aéreas mais proximais, sendo o diferencial de células mais rico em neutrófilos e eosinófilos, com menos macrófagos alveolares.<sup>21,67</sup>

---

Para assegurar coleta de material de vias aéreas mais inferiores e evitar diferenças entre as amostras coletadas, recomenda-se o uso de nebulizações com tempos constantes<sup>44</sup> e mais prolongados. Atualmente sugere-se um tempo total de nebulização de pelo menos 15 minutos, podendo as nebulizações serem realizadas por mais cinco minutos se uma amostra adequada de escarro não tiver sido obtida.<sup>21,62</sup> O período total de nebulizações deve sempre ser citado, a fim de possibilitar adequada comparação entre os resultados dos diferentes estudos publicados.<sup>62</sup>

#### Qualidade da amostra de escarro

Independente de qual método for escolhido, o objetivo principal é obter uma amostra adequada. O escarro é composto por líquidos e componentes celulares como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, células da mucosa brônquica e células inflamatórias. Quando expectorado há mistura com saliva, células epiteliais escamosas e bactérias da orofaringe.<sup>68</sup> A contaminação por saliva, rica em células escamosas, é um problema comum. As células escamosas são células grandes que, em concentrações elevadas, dificultam a visualização das outras células.<sup>21,68</sup> Essa contaminação pode ser minimizada se o paciente lavar a boca com água (antes de iniciar o exame e durante o intervalo das nebulizações) e se assoar o nariz antes do início da indução.<sup>21,68</sup>

Após processada, a amostra é considerada adequada se houver concentrações de células escamosas inferiores a 20%,<sup>34,53,59,68</sup> uma viabilidade celular superior a 50%<sup>34,53,68</sup> e possibilidade de analisar pelo menos 400 células.<sup>34,62,68</sup>

---

### Efeitos colaterais da indução de escarro

Ainda não foi registrado nenhum efeito colateral grave em pessoas submetidas ao EI. Os eventos adversos mais comuns são salivação, boca salgada, náuseas, tosse, dispnéia e broncoconstricção. A salivação, a boca salgada e as náuseas podem ser evitadas se o paciente lavar a boca com água antes de cada nebulização. Os sintomas respiratórios podem ser prevenidos com inalação de salbutamol antes do início do exame.<sup>62,63</sup>

### Processamento do escarro induzido

Há duas técnicas atualmente utilizadas: uma seleciona (através de um microscópio invertido) os “plugs” de secreção, tentando assim diminuir a quantidade de saliva na amostra a ser processada. A outra técnica processa todo o material coletado, sem separação da saliva. A vantagem de selecionar o escarro é a menor contaminação por saliva, sendo conseqüentemente menor a percentagem de células escamosas nas lâminas processadas. A desvantagem deste método é a necessidade de um microscópio invertido (nem sempre disponível nos laboratórios) e a maior demora no processamento da amostra.<sup>24,69</sup>

O material pode ser processado em até 9 h após a coleta se armazenado a -4 °C,<sup>52</sup> mas recomenda-se o processamento da amostra em até 2 horas.<sup>53,54,70</sup>

---

#### **1.1.4 Comparação entre amostras obtidas por escarro induzido e por lavado broncoalveolar**

A proporção de eosinófilos na via aérea inferior já foi bem descrita e validada em amostras obtidas por LBA.<sup>71-73</sup>

No escarro induzido, a proporção de eosinófilos encontra-se também validada,<sup>70</sup> sendo consideradas normais pela maioria dos estudos amostras com menos de 3% de eosinófilos.<sup>21,37,38,74</sup> A proporção destas células se mostrou semelhante entre amostras coletadas por EI e por LBA.<sup>30</sup>

As concentrações normais de neutrófilos, macrófagos e linfócitos no EI e também no LBA ainda não estão validadas. A percentagem de neutrófilos no escarro induzido de indivíduos normais se mostrou bastante variada, com índices de 20 a 60%,<sup>37,38,61,74,75</sup> bem superiores aos valores encontrados no LBA.<sup>71-73</sup> Esta variabilidade pode ser explicada pela amostragem de compartimentos diferentes e mais proximais da árvore respiratória, observada na técnica do EI.<sup>44,61</sup>

Para fins de pesquisa e de avaliação de resposta a tratamento, sugere-se a coleta de células da mucosa brônquica utilizando sempre o mesmo método. Como o EI é a técnica menos invasiva, tem sido a técnica eleita pela maioria dos estudos.<sup>21,30, 33,34,36,39,40</sup>

---

### **1.1.5 Comparação entre amostras obtidas por escarro espontâneo e por escarro induzido**

Pacientes em exacerbação de asma ou com outras doenças pulmonares crônicas costumam produzir escarro espontaneamente. As concentrações de células e mediadores inflamatórios é semelhante entre amostras obtidas por escarro espontâneo e por EI. Entretanto, as amostras obtidas pelo EI são de melhor qualidade: a viabilidade celular é maior e as lâminas preparadas possibilitam uma melhor visualização das células, com resultados mais acurados.<sup>76,77</sup>

Recomenda-se a análise do EI mesmo nos pacientes que apresentam amostras espontâneas de escarro. Isto possibilita uma adequada comparação com outros pacientes que não tenham conseguido uma amostra espontânea.<sup>62</sup>

### **1.1.6 Uso do EI no estudo da asma**

A influência dos fatores ambientais na asma tem sido amplamente estudada em grandes estudos epidemiológicos.<sup>5,9,17-19</sup> A avaliação de características inflamatórias por meio do EI pode ser incluída em estudos epidemiológicos e quem sabe relações entre padrões inflamatórios e fatores de risco possam ser encontrados, enriquecendo ainda mais a caracterização de cada fenótipo de asma.<sup>21</sup>

---

Outra vantagem do EI é a viabilidade de seu uso em crianças.<sup>78</sup> Esta técnica contribuiu de forma significativa no estudo da inflamação de via aérea neste grupo de pacientes, onde a realização de broncoscopia com LBA muitas vezes não era possível por implicações éticas (não autorização pelos pais, por exemplo). Gibson publicou em 1998 um estudo descrevendo o uso do EI em crianças com asma. O método se mostrou seguro e com taxas de sucesso semelhantes aos adultos, sendo viável em crianças a partir de 6 anos de idade.<sup>78</sup>

Considerando a existência de fenótipos diversos de asma (contrariando a antiga classificação de asma como sendo em todos os casos associada a alergia) e sua relação com diferentes padrões inflamatórios (como eosinofilia ou neutrofilia no escarro), observa-se uma crescente necessidade de estudos nesta área. Ainda há poucos estudos que combinem esta avaliação fenotípica com achados inflamatórios de vias aéreas inferiores, principalmente na população pediátrica.

---

## 1.2 JUSTIFICATIVA

O EI é um método não-invasivo muito útil não só para avaliar o padrão inflamatório da asma, mas também facilita a adequação das medicações anti-inflamatórias de uso comum em asmáticos e ajuda no monitoramento da melhora clínica do paciente.

A maioria dos estudos que avaliam o processo inflamatório através da técnica do EI têm sido feitos em pacientes adultos e, portanto, dados de pacientes pediátricos são ainda escassos. Um avanço importante de nosso estudo é a identificação do tipo de resposta inflamatória em crianças com diferentes fenótipos clínicos da asma, comparados a uma população de controles sem doença respiratória.

Estas novas informações têm o potencial de modificar a maneira como identificamos e, conseqüentemente, como tratamos nossos pacientes pediátricos com asma. Sabe-se que a asma é uma doença de caráter multifatorial, influenciada por características étnicas, genéticas, ambientais e sócio-culturais, além de outras ainda desconhecidas. Graças a isto se faz necessário o estudo da resposta inflamatória de vias

---

aéreas em condições típicas de cada região, obtendo-se assim resultados representativos de cada população. A identificação de qual fenótipo e qual padrão inflamatório é predominante em cada região pode levar à utilização de técnicas terapêuticas mais adequadas ao padrão da doença, específicas para cada paciente (menos uso de corticóides na asma não-eosinofílica, por exemplo).

O presente estudo se justifica pela carência de informações referentes à inflamação da mucosa brônquica na população brasileira e no Rio Grande do Sul. Não há até o momento nenhum dado no sul do Brasil descrevendo padrões inflamatórios em crianças com fenótipos de asma atópica e não-atópica, assim como não há estudos comparando os achados com crianças sem doença respiratória.

---

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 Objetivo Geral**

Descrever características citológicas do escarro induzido (percentagem de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos) em crianças com diferentes fenótipos de asma.

### **1.3.2 Objetivo Específico**

Avaliar a concentração de eosinófilos e neutrófilos no escarro induzido de três grupos de crianças: asmáticos atópicos, asmáticos não-atópicos e controles normais.

---

## 1.4 HIPÓTESES

- Crianças com asma atópica apresentam maior concentração de eosinófilos nas amostras de escarro induzido, comparadas a crianças com asma não-atópica e a controles normais.
  
  - Nas crianças com asma não-atópica há predomínio de uma inflamação não-eosinofílica. Nestas crianças a concentração de neutrófilos é significativamente superior, quando comparadas às crianças com asma atópica e aos controles.
-

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumol* 2002;28(Supl 1).
  2. Burr ML, Butland BK, King S, Vaughan-Williams E. Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart. *Arch Dis Child* 1989;64(10):1452-6.
  3. Ninan TK, Russell G. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ* 1992;304(6831):873-5.
  4. DATASUS MdSGF. Informações de Saúde – DATASUS. In: Saúde Md, editor. Volume 2005: Ministério da Saúde / Governo Federal;2002.
  5. Sole D, Yamada E, Vana AT, Werneck G, Solano de Freitas L, Sologuren MJ, et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2001;11:123-8.
  6. Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:161-6.
  7. Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. *Paediatric Respiratory Reviews* 2004;5:155-61.
-

8. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 1999;54(3):268-72.
  9. Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998;12(2):315-35.
  10. Faniran AO, Peat JK, Woolcock AJ. Prevalence of atopy, asthma symptoms and diagnosis, and the management of asthma: comparison of an affluent and a non-affluent country. *Thorax* 1999;54:606-10.
  11. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, Bacharier LB, Boehmer SJ, Krawiec M, et al. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1282-7.
  12. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel S. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:101-8.
  13. Céledon JC, Wright RJ, Litonjua AA, Sredl D, Ryan L, Weiss ST, et al. Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1239-43.
  14. Holt PG. Parasites, atopy and the hygiene hypothesis: resolution or a paradox? *Lancet* 2000;356:1699-700.
  15. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, daycare attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000;343:538-43.
  16. von Mutius E, Illi S, Hirsch T, Leupold W, Keil U, Weiland SK. Frequency of infections and risk of asthma, atopy and airway hyperresponsiveness in children. *Eur Respir J* 1999;14:4-11.
-

17. Wright AL, Taussig LM, Ray CG, Harrison HR, Holberg CJ. The Tucson Children's Respiratory Study. II. Lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am J Epidemiol*. 1989;129:1232-46.
  18. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, et al. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003;349:1414-22.
  19. Oswald H, Phelan PD, Lanigan A, Hibbert M, Bowers G, Olinski A. Outcome of childhood asthma in mid-adult life. *BMJ* 1994;309:95-6.
  20. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:893-910.
  21. Djukanovic R. Induced Sputum. Chestnet, PCCU, lesson 4, vol. 16  
[www.chestnet.org/education/online/pccu/vol16/lessons3-4/lesson04.php](http://www.chestnet.org/education/online/pccu/vol16/lessons3-4/lesson04.php)
  22. Cai Y, Carty Y, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J* 1998;11:848-53.
  23. American Thoracic Society. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1202-18.
  24. Global Initiative of Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda(MD): National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health;2002. NIH publication 02-3659. Available at: <http://www.ginasthma.com>
  25. Green RH, Brighling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding PI, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophils counts: a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-21.
  26. Jayaram L, Pizzichini MM, Cock RJ, Boulet LP, Lemiere C, Pizzichini E, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006;27:483-94.
-

27. Leuppi JD, Salome CM, Jenkis CR, Anderson SD, Xuan W, Marks GB, et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:406-12.
  28. Jatakanon A, Slim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:64-72.
  29. Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, et al. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:36-41.
  30. Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, Kluin-Nelemans JC, van Krieken JF, Veselic-Charvat M, et al. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 1997 Jul;27(7):769-79.
  31. Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, Barbes PJ. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1997 Apr;52(4):372-4.
  32. Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, et al. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J* 2002;20:40s-43s.
  33. Kips JC, Inman MD, Jayaram L, Bel EH, Parameswaran K, Pizzichini MMM, et al. The use of induced sputum in clinical trials. *Eur Respir J* 2002;20:47s-50s.
  34. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-9.
  35. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993 May;147(5):1126-31.
-

36. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproductibility and validity of and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Aug;154(2 Pt 1):308-17.
  37. Spanevello A, Confaloniere M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity. References values and distribution in normal volunteer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Sep;162(3 Pt 1):1172-4.
  38. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE, et al. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Feb;161(2 Pt 1):475-8.
  39. Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, Silverman M. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax* 2000 Sep;55(9):768-74.
  40. Magnussen H, Holz O, Sterk PJ, Hargreave FE. Noninvasive methods to measure airway inflammation: future considerations. *Eur Respir J* 2000;16:1175-9.
  41. Bickerman HA, Sproud EE, Barach AL. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technique for detection of lung cancer. *Dis Chest* 1958;4:347-62.
  42. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997 Jun;52(6):498-501.
  43. Nocker RE, Out TA, Weller FR, de Riemer MJ, Jansen HM, van der Zee JS. Induced sputum and bronchoalveolar lavage as tools for evaluating the effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *J Lab Clin Med* 2000 Jul;136(1):39-49.
  44. Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(7):1146-9.
-

- 
45. Basyigit I, Yildiz F, Ozkara SK, Boyaci H, Ilgazli A. Inhaled corticosteroid effects both eosinophilic and non-eosinophilic inflammation in asthmatic patients. *Mediators Inflamm* 2004 Aug;13(4):285-91.
  46. Gibson PG, Saltos N, Fakes K. Acute anti-inflammatory effects of inhaled budesonide in asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Jan;163(1):32-6.
  47. Deykin A, Lazarus SC, Fahy JV, Wechsler ME, Boushey HA, Chinchilli VM, et al. Sputum eosinophil counts predict asthma control after discontinuation of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2005 Apr;115(4):720-7.
  48. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, et al. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 May;171(10):1077-82.
  49. Bacci E, Cianchetti S, Bartoli M, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, et al. Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest* 2006;129:565-72.
  50. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet* 1999;353(9171):2213-4.
  51. Jatakanon A, Uasuf C, Masiak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1532-9.
  52. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:843-52.
  53. Palomino AL, Bussambra MH, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Nunes MT, Rodrigues JC. Escarro induzido em crianças e adolescentes com asma: segurança, aplicabilidade clínica e perfil de células inflamatórias em
-

- pacientes estáveis e durante exacerbação. *J Pediatr (Rio J)* 2005;81(3):216-24.
54. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 2002;57:875-9.
55. Douwes J, Gibson PG, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002;57:643-8.
56. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006 Jan;11(1):54-61.
57. Brightling CE. Clinical Applications of Induced Sputum. *Chest* 2006;129:1344-48.
58. Kurukulaaratchy RJ, Fenn M, Matthews S, Arshad SH. Characterisation of atopic and non-atopic wheeze in 10 years old children. *Thorax* 2004;59:563-8.
59. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995;8:559-65.
60. Kelly MG, Brown V, Martin SC, Ennis M, Elborn JS. Comparison of sputum induction using high-output and low-output ultrasonic nebulizers in normal subjects and patients with COPD. *Chest* 2002;122:955-9.
61. Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:866-9.
62. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J* 2002;20:3S-8S.
-

63. Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma. Kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1501-6.
  64. Polgar CPV. Standart values. In: Pulmonary function testing in children: techniques and standards. Saunders W, editor. Philadelphia;1971.87-122p.
  65. Riedler J, Reade T, Dalton M, Host D, Robertson C. Hypertonic saline challenge in an epidemiologic survey of asthma in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(6 Pt 1):1632-9.
  66. Weiland SK, Bjorksten B, Brunekreef B, Cookson WO, von Mutius E, Strachan DP. Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods. *Eur Respir J* 2004;24(3):406-12.
  67. Gershman NH, Liu H, Wong HH, Liu JT, Fahy JV. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different points. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:322-8.
  68. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996;9:1174-80.
  69. Efthimiadis A, Spanevello A, Hammid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur Respir J* 2002;20(Suppl.37):S19-S23.
  70. Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. *Eur Respir J* 2000;16:355-9.
  71. Riedler J, Grigg J, Stone C, Tauro G, Robertson CF. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:163-8.
-

- 
72. Ratjen F, Bredendiek M, Zheng L, Brendel, Costabel U. Lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid of children without bronchopulmonary disease. *Am J Crit Care Med* 1995;152:174-8.
  73. Midulla F, Villani A, Merolla R, Bjermer L, Sandstrom T, Ronchetti R. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:112-118.
  74. Sozanska E, Gasior G, Semik A, Barczuk A, Purzchala W. Range in the normal values for induced sputum cells in Silesian population. *Pneumol Alergol Pol* 2005;73(2):148-52.
  75. Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw Aj, et al. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest* 2005 Dec;128(6):4049-50.
  76. Moodley YP, Krishnan V, Laloo VG. Neutrophils in induced sputum arise from central airways. *Eur Respir J* 2000 Jan;15(1):36-40.
  77. Bartoli ML, Bacci E, Carnevali S. Quality evaluation of samples obtained by spontaneous or induced sputum: comparison between two methods of processing and relationship with clinical and functional findings. *J Asthma* 2002;39:479-86.
  78. Gibson PG. Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:S100-01
-

---

## **CAPÍTULO II**

---

---

# **MÉTODOS E ESTRATÉGIAS DE PESQUISA**

**2.1 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

**2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

**2.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

**2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## **2.1 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **2.1.1 Delineamento**

Estudo de caso-controle.

### **2.1.2 Local**

Laboratório Biosul (Uruguaiana-RS) e Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (Laboratório de Pediatria, Hospital São Lucas, Porto Alegre-RS).

### **2.1.3 População e amostra**

De um total de quase 2000 crianças da cidade de Uruguaiana-RS (entre 11 e 15 anos de idade), dados de história e fatores de risco para asma e alergia foram coletados

---

através do questionário padronizado e pré-validado do estudo ISAAC-fase II, em um estudo realizado em 2003 por Pereira e colaboradores.<sup>1</sup>

Um subgrupo de 1200 crianças (amostra aleatória e representativa) foi também submetido a testes cutâneos para resposta a alérgenos ambientais comuns.<sup>1</sup> Destas 1200 crianças, 90 foram sorteadas para o presente estudo e divididas entre os três grupos abaixo:

AA (asma atópica): 30 crianças com asma ativa e teste cutâneo positivo;

ANA (asma não-atópica): 30 crianças com asma ativa e teste cutâneo negativo;

NANA (não-asmáticos, não-atópicos, contoles normais): 30 crianças sem asma ou sibilância alguma vez na vida e com teste cutâneo negativo (não asmáticos, não-atópicos).

### **2.1.3.1 Tamanho da amostra**

Kips e colaboradores sugerem que cada grupo de pesquisa determine o tamanho de amostra baseado em dados de variabilidade e reprodutibilidade da concentração de eosinófilos no escarro de sua própria população.<sup>2</sup> Não dispomos destes dados em amostras de crianças brasileiras. Graças a isto, não foi possível realizar um cálculo de tamanho amostral. O presente estudo foi realizado como um estudo-piloto, podendo servir de base para definir tamanho de amostra em futuros estudos do nosso grupo de

---

pesquisa. Tomando-se por base os estudos relatados na literatura este número de 90 crianças pareceu adequado.

#### **2.1.4 Critérios de inclusão**

- Crianças de 11 a 15 anos, participantes do estudo ISAAC na cidade de Uruguaiana-RS;
- Teste cutâneo previamente realizado;
- Consentimento por escrito fornecido pelo representante legal.

#### **2.1.5 Critérios de exclusão**

- Incapacidade de realizar espirometria (segundo critérios da *American Thoracic Society - ATS*);<sup>3</sup>
  - VEF1 basal inferior a 75% do previsto;<sup>4</sup>
  - Crianças com idade gestacional ao nascimento inferior a 37 semanas;
  - Uso de corticoterapia oral ou inalatória nos últimos 30 dias;
-

- Uso de drogas antiinflamatórias nos últimos 30 dias (incluindo inibidores de leucotrienos);
- Exacerbação de asma ou de rinite alérgica nos últimos 30 dias;
- Infecção de via aérea (superior ou inferior) nos últimos 30 dias;
- Doenças crônicas de via aérea exceto asma (fibrose cística, bronquiolite obliterante, fibrose pulmonar, pneumonias de repetição, doença intersticial);
- Doença cardíaca associada;
- Imunodepressão (SIDA, imunodeficiências congênita ou adquirida, leucemia, linfoma);
- Uso de drogas imunossupressoras nos últimos 30 dias.

### **2.1.6 Descrição dos procedimentos**

Os pacientes foram submetidos à indução de escarro com inalação prévia de salbutamol spray. As amostras foram processadas em um prazo máximo de 2 horas (no Laboratório Biosul, em Uruguaiana-RS) e a análise das características citológicas foi realizada no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

---

### **2.1.6.1 Termo de consentimento**

Foi acrescentado um adendo (anexo 1) ao termo de consentimento livre e esclarecido aplicado no estudo de Pereira e colaboradores<sup>1</sup> (anexo 2). O adendo foi lido pelo mesmo entrevistador que havia aplicado o questionário ISAAC em 2003<sup>1</sup>, sendo esclarecidas todas as dúvidas da criança e de seu representante legal. No caso de concordância em participar do atual estudo, o adendo foi assinado pelo paciente, por seu responsável legal e pelo investigador que aplicou o questionário. Uma cópia ficou em poder do paciente.

### **2.1.6.2 Aplicação do questionário**

Todas as crianças incluídas responderam em 2003<sup>1</sup> ao questionário padronizado da fase II do estudo ISAAC, traduzido para o português e pré-validado.<sup>5</sup> Para o presente estudo foram repetidas as questões principais referentes a sibilância nos últimos 12 meses (“Seu filho/a apresentou chiado (tipo miado de gato ou apito) nos últimos 12 meses?”) e diagnóstico de asma alguma vez na vida (“Seu filho/a teve asma alguma vez na vida?”) (anexo 3).<sup>1,5</sup> Estas questões foram aplicadas aos pais ou representantes legais das crianças imediatamente antes da indução do escarro, sendo preenchidas por uma coletadora treinada segundo critérios do ISAAC.<sup>5</sup> As respostas do questionário atual

---

foram comparadas às fornecidas ao questionário aplicado em 2003,<sup>1</sup> sendo os grupos definidos baseados nas respostas atuais.

As crianças com história de sibilância nos últimos 12 meses e história de asma alguma vez na vida foram classificadas como asma ativa, conforme recomendado pelo estudo ISAAC.<sup>5</sup> Foram considerados controles não-asmáticos os indivíduos que nunca sibilaram e que nunca apresentaram história de asma ou de sibilância na vida.<sup>5</sup> Os pais ou o representante legal foram também questionados quanto à presença de sintomas respiratórios nos últimos 30 dias (anexo 3).

### **2.1.6.3 Testes cutâneos**

Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos, no estudo de Pereira e colaboradores,<sup>1</sup> a testes cutâneos para seis alérgenos ambientais comuns (*Dermatophagoides pteronissinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Alternaria alternata*, extrato de gramíneas, extrato de árvores e epitélio de gato). Histamina 10mg/ml foi utilizada como controle positivo e glicerina, como controle negativo (importante na detecção de reação inespecífica como o dermatografismo ou uma reatividade traumática que possa ocorrer ocasionalmente).<sup>1</sup> Foram utilizados extratos, soluções de controle e lancetas do laboratório ALK-Horsholm-Dinamarca.

Os profissionais que aplicaram os testes cutâneos receberam treinamento de acordo com a padronização do estudo ISAAC.<sup>5</sup> A reprodutibilidade dos resultados foi

---

---

testada em três séries de 16 testes com histamina 10mg/ml para avaliar a performance de cada coletador. Todos os resultados encontram-se devidamente documentados.<sup>1</sup>

Os testes cutâneos foram realizados durante o período matutino (existe um ritmo circadiano que influi no tamanho da reação cutânea aos alérgenos e à histamina, devendo por isso o exame ser realizado pela manhã).<sup>1</sup> O local da pele devia estar livre de eczema, respeitando-se um intervalo de 2 a 2,5 cm entre cada gota de extrato e uma distância de 5 cm em relação ao pulso e de 3 cm em relação à fossa antecubital. As gotas dos extratos foram colocadas sempre na mesma seqüência, da esquerda para a direita. Uma lanceta individual foi utilizada para cada gota (a fim de evitar contaminação), marcando a epiderme em um ângulo ente 45° a 60°.<sup>1</sup>

A leitura foi feita após 15 minutos, sendo o edema e o eritema medidos com uma régua transparente (em milímetros) e comparados com os controles positivos e negativos. O contorno de cada reação foi marcado com uma caneta de filtro fino e a medida da reação foi feita através da soma do maior diâmetro horizontal da pápula com seu maior diâmetro vertical, dividido por dois. Quando esta medida era  $\geq 3$  mm do diâmetro médio do halo do controle negativo, o teste era considerado positivo.

As crianças foram consideradas atópicas quando apresentavam o teste cutâneo positivo para pelo menos um dos alérgenos testados.<sup>1,5</sup>

---

#### **2.1.6.4 Indução de escarro**

Os pesquisadores foram submetidos em dezembro de 2005 a um treinamento para indução do escarro no Núcleo de Pesquisas em Asma e Infecções de Vias Aéreas da Universidade Federal de Santa Catarina (NUPAIVA-UFSC-Florianópolis-SC), centro de referência para pesquisas com escarro induzido no Brasil. Após este período foi realizado um teste piloto com indução e processamento do escarro nos próprios pesquisadores, entre janeiro e março de 2006. Uma vez confirmada a realização adequada do exame, procedeu-se à coleta de dados.

O escarro foi induzido no Laboratório Biosul (na cidade de Uruguaiana-RS) e as crianças foram identificadas pelo mesmo número utilizado no estudo de Pereira e colaboradores.<sup>1</sup> Imediatamente antes do exame, as perguntas do questionário ISAAC que se referiam a sintomas recentes foram novamente realizadas (Anexo 3) e o uso de medicamentos concomitantes, assim como o peso em kg (medido com balança digital) e a altura em cm (medida com antropômetro recomendado pelo ISAAC)<sup>5</sup> foram registrados (Anexo 4).

O mesmo período de nebulização foi respeitado em todas as crianças. Além disso, as nebulizações foram realizadas pelo período máximo recomendado pela literatura, totalizando 20 minutos.<sup>6</sup> O protocolo de indução por nós adotado consiste em uma modificação do descrito por Pin e colaboradores.<sup>7,8</sup>

Material utilizado: Nebulizador ultrassônico ULTRA-NEB DeVilbiss - Large Volume 2000<sup>®</sup> (diâmetro das partículas entre 0,5 e 5 µm), válvula não-reinalante de 2 vias

---

(número 2700), bocal Vacumed 1001<sup>®</sup>, espirômetro (MicroLab-SuperSpiro<sup>®</sup>) calibrado conforme critérios da ATS,<sup>3</sup> espaçador FLUMAX<sup>®</sup>, balança digital (para peso do paciente), antropômetro, solução salina 4,5%, salbutamol spray (Aerolin Spray<sup>®</sup>), frascos estéreis.

Após explicação de como realizar manobras adequadas, três curvas espirométricas eram realizadas.<sup>3</sup> O valor basal do VEF1 e da relação VEF1/CVF da melhor curva espirométrica<sup>3,9</sup> eram registrados. Se o paciente apresentasse o valor basal de VEF1 inferior a 75% do previsto<sup>4</sup>, o mesmo seria excluído do estudo. Caso contrário, prosseguia-se o exame, sendo administrados 200 mcg de salbutamol spray (com auxílio do espaçador Flumax<sup>®</sup>) e após dez minutos realizadas mais três curvas espirométricas. O maior VEF1 obtido após o uso do salbutamol spray era utilizado para cálculo do “valor de alerta”, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Valor de alerta (VEF1 com 15\% de queda)} = \text{VEF1 pós-salbutamol} \times 0,85$$

Este valor era utilizado como padrão de segurança do exame: se durante a indução do escarro o VEF1 caísse além de 15%, o exame deveria ser interrompido.<sup>7</sup>

Antes do início da indução, as crianças eram instruídas a lavar a boca com água (gargarejo) por três vezes.<sup>10</sup> Era também demonstrado como obter escarro da via aérea inferior (através da realização de uma tosse intensa e prolongada, seguida de expectoração).<sup>7</sup>

---

Enquanto um pesquisador realizava as espirometrias e explicava às crianças como realizar o exame, outro preparava o sistema para as nebulizações. Solução salina a 4.5% era colocada no nível padronizado e indicado pelo frasco do nebulizador ultrassônico. O frasco era conectado ao nebulizador e à mangueira do mesmo. Na outra extremidade da mangueira, conectava-se um bocal com válvula não-reinalante. O material era higienizado entre cada exame.

Após explicada a manobra da tosse e uma vez montado o sistema de nebulização, demonstrou-se como seria realizado o exame. A boca das crianças era mantida fechada em volta do bocal acoplado à válvula não-reinalante e ao sistema de nebulização, evitando-se escape de ar. Um clipe nasal era utilizado para assegurar uma respiração exclusivamente oral. Era então solicitado à criança que respirasse normalmente (em volume-corrente) pela boca e que, havendo necessidade de tossir, a tosse fosse realizada preferencialmente sem a retirada do bocal.

Uma vez estando a criança confortável e sem dúvidas quanto às manobras a serem realizadas, era iniciada a indução do escarro. As nebulizações eram realizadas por quatro períodos de cinco minutos (totalizando 20 minutos de exposição à solução salina), controlados com o auxílio de um cronômetro. Após cada período de cinco minutos, o nebulizador era desligado, retirando-se o bocal e lavando-se a boca do paciente com água. No intervalo de um minuto (respeitado entre cada nebulização) era medido o VEF1 e encorajado as crianças a tossirem. Se o VEF1 era superior ao “valor de alerta”, o exame era continuado.

Se a medida do VEF1 em algum momento era inferior ao valor de alerta, 200

---

mcg de salbutamol eram administrados via inalatória e após dez minutos, repetida a mensuração do VEF1. Se o VEF1 retornasse a pelo menos 90% do valor basal, as nebulizações poderiam ser recomeçadas. Por exemplo, se o VEF1 fosse 100% antes de iniciar a indução de escarro, a percentagem de queda de 15% aceitável implicaria em um VEF1 de 85%. Se durante o exame fosse registrado um VEF1 abaixo de 85%, a indução deveria ser interrompida e só reiniciada se após a administração de 200 mcg de salbutamol spray fosse atingido um VEF1 de pelo menos 90%.<sup>6,7,11,12</sup>

Os critérios utilizados para o término da indução foram o tempo total de nebulização de 20 min, uma queda persistente de VEF1 além de 15% e a solicitação de interrupção do exame por parte da criança.<sup>6,13</sup>

Terminada a indução do escarro, uma última espirometria era realizada, sendo as crianças liberadas se o VEF1 aferido atingisse pelo menos 90% do valor basal e não houvesse desconforto respiratório ao exame físico. Caso contrário, as crianças deveriam ficar sob os cuidados do pesquisador até resolução dos sintomas.

Os dados obtidos (medidas de VEF1 e de VEF1/CVF, tempo para obtenção da primeira amostra de escarro, tempo total de nebulização, início e término da indução, medidas antropométricas, intercorrências clínicas) eram devidamente registrados (anexo 4). Todas as amostras de escarro eram armazenadas em frascos estéreis, sendo mantidas em um refrigerador a -4°C até que fosse iniciado o seu processamento. Para garantir resultados acurados, as amostras foram processadas em um intervalo de máximo 2 horas.<sup>6, 14</sup>

---

### 2.1.6.5 Processamento da amostra

Empregamos um protocolo modificado do descrito por Pizzichini colaboradores.<sup>12,15,16</sup>

Material utilizado: Microscópio óptico, citocentrífuga (Eppendorf Citocentrifuge 5417C<sup>®</sup>) e filtros estéreis para citocentrífuga, “Shaker” (3D Rocking Platform STR9<sup>®</sup>), pipetas ajustáveis (de dez a 40 mcl, de 40 a 200 mcl e de 200 a 1000 mcl), pontas de pipeta estéreis, pipeta Pasteur<sup>®</sup>, lâminas, placa de Neubauer<sup>®</sup> (hemocítômetro), filtros de nylon (Millipore<sup>®</sup>, 60 mcm), ditioneitol (DTT<sup>®</sup>, concentração de 1000,56 mcl/10 ml, Calbiochem Corp, San Diego, CA), azul de tripan, PBS (Phosphate buffered saline), água destilada (AD), placas de Petri<sup>®</sup> estéreis, tubos de Eppendorf<sup>®</sup> estéreis (1,5 ml), tubos de Falcon<sup>®</sup> estéreis (15 ml), criotubos estéreis, cilindro de nitrogênio, metanol.

Processamento:

Parte do DTT foi rediluída em 1:10 (1 ml de DTT + 9 ml de AD): esta solução poderia ser utilizada por até 48 h, caso armazenada a 4 °C. No presente estudo utilizamos esta orientação, rediluído-se o DTT a cada 48 h.

Cada amostra de escarro era colocada em uma placa de Petri, separando-se (com o auxílio de uma pipeta estéril e a “olho nu”) o escarro da saliva.<sup>12</sup> Uma vez separado o

---

escarro da saliva, o mesmo era transferido da placa de Petry para um tubo de Falcon, na quantidade mínima de 100 mcL e máxima de 1 mL. O volume total do escarro obtido era registrado. A seguir era adicionada a solução rediluída de DTT em quatro vezes o volume do escarro, misturando-se delicadamente o conteúdo com o auxílio de uma pipeta. O tubo de ensaio era então colocado no “Shaker” por 30 minutos, homogeneizando-se o escarro com o DTT (no caso de escarro muito densos, este tempo poderia ser aumentado para 60 minutos). Após este período, era adicionado PBS (também em quatro vezes o volume inicial do escarro), sendo a amostra homogeneizada delicadamente por mais cinco minutos: a solução resultante era filtrada através de um filtro de nylon de 60 mcm (para evitar perda da amostra nas fibras do filtro, este era antes embebido em PBS).

O volume filtrado era documentado (V1). Num tubo de Eppendorf<sup>®</sup>, 25 mcL desse volume eram delicadamente misturados com 25 mcL de azul de tripan. Esta solução era colocada no hemocitômetro onde, com auxílio do microscópio óptico no aumento de 400 x, era realizada a contagem total de células (TCC). Eram contadas células de quadrantes de duas áreas diagonalmente opostas do hemocitômetro, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{TCC} = \frac{\text{contagem de células inflamatórias}}{\text{número de quadrantes contados}} \times 2,22 = \dots \times 10^6/\text{mL}$$
$$\dots = C1$$

No hemocitômetro era também definida a viabilidade celular: as células eram

consideradas vivas se ficassem transparentes. As células mortas eram aquelas coradas de azul (impregnadas pelo azul de tripan). Foram consideradas adequadas as amostras com viabilidade superior a 50%.<sup>12,16</sup> A viabilidade celular era calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número total de células}} \times 100$$

Após calculadas a viabilidade celular e a TCC, o restante do V1 era centrifugado a 3000 rpm por dez minutos. O sobrenadante era aspirado e armazenado em um tubo de Eppendorf<sup>®</sup> a -80 °C, no cilindro de nitrogênio (este material será utilizado para posterior dosagem de citocinas pró-inflamatórias). Ao precipitado era acrescentado um volume de PBS (V2), conforme uma das recomendações abaixo:

a)  $V2 = C1 \times V1$

- b) Se o volume calculado de V2 era superior a 10 ml, a suspensão era recalculada para manter uma concentração final de  $1 \times 10^6$ /ml. Acrescentava-se ao precipitado um volume de PBS igual ao V1. Um ml era retirado desta solução e a ele acrescentado PBS até chegar ao volume de C1 em ml.

Exemplo: se tivéssemos uma amostra com  $TCC = 5 \times 10^6$  (onde  $C1 = 5$ ) e com  $V1 = 5,2$  ml (volume filtrado), o volume de suspensão pelo cálculo  $V2 = C1 \times V1$  seria 26 ml. Neste caso a suspensão deveria ser realizada acrescentando-se 5,2 ml (V1) de PBS ao precipitado. Disto, 1 ml era retirado e acrescido de 4 ml de PBS (volume

---

necessário para completar os 5 ml de C1). Esta diluição garante uma concentração de  $1 \times 10^6$ /ml.

Uma vez calculada a adequada suspensão, o conteúdo (precipitado + PBS) era homogeneizado até que o precipitado estivesse completamente disperso no PBS. Setenta mcL desta solução eram a seguir colocados em cada lâmina da citocentrífuga (pelo menos 4 lâminas eram preparadas para cada paciente), sendo centrifugadas por cinco minutos a 500 rpm.

As lâminas eram identificadas pelo registro da criança e fixadas com metanol.

#### **2.1.6.6 Exame citológico diferencial**

As lâminas (fixadas com metanol em Uruguaiana-RS) foram levadas até o laboratório de Pediatria do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (Porto Alegre-RS), onde foram coradas e analisadas por um profissional com experiência em citologia e previamente treinado,<sup>17</sup> o qual não foi informado sobre a classificação das crianças. Apenas o pesquisador principal sabia quem pertencia a cada grupo estudado (asma atópica, asma não-atópica e controles), e este não interferiu na análise das lâminas.

Todas as amostras eram coradas com May-Grumwald-Giemsa (MGG), na diluição de 1:9 (uma parte de MGG para nove partes de AD), por cinco minutos. Após este período, as lâminas eram mantidas em AD, por mais cinco minutos. Foram aceitas

---

apenas as lâminas que tivessem um máximo de 20% de células escamosas e viabilidade celular superior ou igual a 50%.<sup>15,18</sup>

Quatrocentas células não-escamosas foram contadas em cada amostra obtida. A concentração de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células broncoepiteliais foi documentada conforme a proporção de cada variável nas 400 células contadas, sendo os dados imediatamente registrados em formulário específico (anexo 4).<sup>6,12,15,19-22</sup>

---

## 2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas (gênero, escolaridade materna superior a 8 anos, mãe fumante, história materna de asma, morador em área melhor urbanizada, hospitalização por bronquiolite, número de irmãos igual ou superior a 1 e percentagem de eosinófilos no escarro  $\geq 3\%$ ) foram apresentadas através de frequência absoluta e percentagens e analisadas por meio do teste de Qui-quadrado. O teste de Qui-quadrado foi aceito se existisse um número inferior a cinco crianças em no máximo 50% as caselas analisadas.

As variáveis contínuas foram inicialmente avaliadas quando a critérios de normalidade. As com distribuição normal (idade, VEF1 basal, VEF1/CVF e VEF1 pós-salbutamol) foram expressas em média, desvio padrão e valor mínimo e máximo, sendo comparadas por meio dos testes de ANOVA e Bonferroni.

As variáveis contínuas com distribuição não-Gausseana (contagem total de células, percentagem de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos no escarro) foram expressas em mediana, intervalo interquartil e valor máximo e mínimo. Para que estas

---

variáveis pudessem ser comparadas por meio de um teste paramétrico, as mesmas foram transformadas para a forma exponencial de  $\log^{10}$ . No caso de variáveis com valor igual a zero, estas foram consideradas como sendo de valor igual a 0.001, para poderem ser a seguir expressas na forma exponencial). Essas variáveis foram também comparadas através dos testes de ANOVA e Bonferroni.

Os programas empregados foram o SPSS versão 13.0 e o Excel 2003.

---

### **2.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

A indução de escarro por meio de nebulizações com solução salina hipertônica tem sido amplamente útil em ensaios clínicos desde 1990. Comparado ao LBA, o escarro induzido é método não-invasivo, mais seguro e não necessita de indução anestésica, sendo de grande benefício no estudo da via aérea na população pediátrica.<sup>11, 23-28</sup>

Os efeitos colaterais possíveis são tosse, broncoconstrição e desconforto respiratório leves. Estes eventos costumam ser transitórios e podem ser prevenidos com a inalação prévia de salbutamol.<sup>11</sup> Náuseas, garganta seca e salivação podem também se fazer presentes, sendo estes sintomas aliviados ao ser a boca lavada com água antes do exame e nos intervalos das nebulizações.

No presente estudo tomamos todas as precauções necessárias para evitar exposições desnecessárias e diminuir a ocorrência de eventos adversos. Foi utilizado salbutamol spray antes do início da indução do escarro, a fim de prevenir uma broncoconstrição e sintomas como tosse e desconforto respiratório. Espirometrias foram

---

realizadas a cada cinco minutos do exame, para detectar precocemente uma possível piora da função pulmonar. Quedas de VEF1 além de 15% do valor basal foram utilizadas como medida de segurança do exame (há estudos que permitem quedas ainda maiores, de até 20%).<sup>26-28</sup>

Todos os procedimentos foram realizados com a concordância do paciente e de seu responsável legal, após esclarecimento de todas as suas dúvidas. Foi garantido ao paciente a confidencialidade e o direito de desistência do estudo, se assim desejado. Os pais ou responsáveis legais receberam um folheto explicativo sobre o procedimento e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, ficando uma cópia do mesmo em seu poder. Não houve conflitos de interesse.

Este projeto foi considerado ético e metodologicamente adequado, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentares de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96), do Conselho Nacional de Saúde, atendendo às resoluções normativas do Grupo de Pesquisa em Pós-Graduação da PUCRS. Foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS (Porto Alegre-RS), em 09 de dezembro de 2005, sob o ofício de número 1181/05-CEP.

---

## 2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira MU. A relação de fatores de risco ambientais e familiares com sibilância em escolares da cidade de Uruguaiana, RS. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da PUCRS, área de concentração em Pediatria. 2005.
  2. Kips JC, Inman MD, Jayaram L, Bel EH, Parameswaran K, Pizzichini MMM, et al. The use of induced sputum in clinical trials. *Eur Respir J* 2002;20:47s-50s
  3. American Thoracic Society. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1202-18.
  4. Polgar CPV. Standart values. In: *Pulmonary function testing in children: techniques and standards*. Saunders W, editor. Philadelphia;1971.87-122p.
  5. Weiland SK, Bjorksten B, Brunekreef B, Cookson WO, von Mutius E, Strachan DP. Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods. *Eur Respir J* 2004;24(3):406-12.
  6. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J* 2002;20:3S-8S.
-

7. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-9.
  8. Kelly MG, Brown V, Martin SC, Ennis M, Elborn JS. Comparison of sputum induction using high-output and low-output ultrasonic nebulizers in normal subjects and patients with COPD. *Chest* 2002;122:955-9.
  9. Global Initiative of Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda(MD): National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health;2002. NIH publication 02-3659. Available at: <http://www.ginasthma.com>
  10. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995;8;559-65.
  11. Djukanovic R. Induced Sputum. Chestnet, PCCU, lesson 4, vol. 16 [www.chestnet.org/education/online/pccu/vol16/lessons3-4/lesson04.php](http://www.chestnet.org/education/online/pccu/vol16/lessons3-4/lesson04.php)
  12. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproductibility and validity of and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Aug;154(2 Pt 1):308-17.
  13. Gershman NH, Liu H, Wong HH, Liu JT, Fahy JV. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different points. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:322-8.
  14. Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. *Eur Respir J* 2000;16:355-9.
  15. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996;9:1174-80.
-

16. Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma. Kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1501-6.
  17. Efthimiadis A, Spanevello A, Hammid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur Respir J* 2002;20(Suppl.37):S19-S23.
  18. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995;8:559-65.
  19. Palomino ALM, Bussambra MHCF, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Nunes MPT, Rodrigues JC, et al. Escarro induzido em crianças e adolescentes com asma: segurança, aplicabilidade clínica e perfil de células inflamatórias em pacientes estáveis e durante exacerbação. *J Pediatr (Rio J)* 2005;81(3):216-24.
  20. Gibson PG. Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:S100-01
  21. Pizzichini MMM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:866-9.
  22. Malerba M, Balbi B, Spanevello A. Aging and induced sputum cells. *Chest* 2005 Dec;128(6):4049-50.
  23. Wong HH, Fahy JV. Safety of one method of sputum induction in asthmatics subjects. *Respir Crit Care Med* 1997;156:299-303.
  24. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993 May;147(5):1126-31.
-

25. Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, et al. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:36-41.
  26. Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, et al. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J* 2002;20:40s-3s.
  27. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997 Jun;52(6):498-501.
  28. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE, et al. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Feb;161(2 Pt 1):475-8.
-

---

## **CAPÍTULO III**

---

---

## **ARTIGO ORIGINAL**

### **Características citológicas do escarro induzido em crianças com asma atópica e asma não-atópica no Sul do Brasil**

#### **3.1 PÁGINA DE ROSTO**

#### **3.2 INTRODUÇÃO**

#### **3.3 MÉTODOS**

#### **3.4 RESULTADOS**

#### **3.5 DISCUSSÃO**

#### **3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

#### **3.7 CARTA DE SUBMISSÃO**

Observações:

- a) Resumo e abstract incluídos nas páginas xv e xvi não foram inseridos neste capítulo para evitar repetições desnecessárias ao leitor.
  - b) Gráficos e figuras foram incluídos no texto (e não indicados em anexo) a fim de harmonizar a apresentação.
-

### 3.1 PÁGINA DE ROSTO

Características citológicas do escarro induzido em crianças com asma atópica e asma não-atópica no Sul do Brasil

Cytological characteristics of induced sputum in children with atopic and non-atopic asthma in Southern Brazil

**Anna Cláudia Drews\***  
**Renato Tetelbom Stein\*\***

\* Mestranda do curso de pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Pediatra, especialização em Pneumologia Pediátrica no Hospital São Lucas da PUCRS. Currículo cadastrado na plataforma Lattes do CNPQ.

\*\* Professor da Faculdade de Medicina e do Curso de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Pneumologista Pediátrico, Doutor em Pediatria pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre, chefe do departamento de Pneumologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS. Currículo cadastrado na plataforma Lattes do CNPQ.

#### **Instituição**

Laboratório de Pediatria do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança da Faculdade de Medicina da PUCRS.

#### **Correspondência e contato pré-publicação**

Anna Cláudia Drews

Rua Dr Armando Odebrecht 70, sala 710. Blumenau –SC – Brasil

Telefones: (47) 3322-6808, (47) 9193-9290

e-mail: [annadrews@pneumoped.com.br](mailto:annadrews@pneumoped.com.br), [annadrews@hotmail.com](mailto:annadrews@hotmail.com)

### 3.2 INTRODUÇÃO

A asma é uma das doenças respiratórias mais prevalentes no mundo, caracterizada por uma inflamação crônica de vias aéreas associada a hiperresponsividade brônquica e limitação ao fluxo aéreo. Mesmo nos quadros mais leves, a inflamação brônquica se faz presente.<sup>1</sup> Graças a isto, a investigação dos padrões inflamatórios se mostrou necessária e de grande valia para um melhor entendimento da fisiopatogenia dessa doença.

O reconhecimento do escarro induzido como um método seguro, acurado e não-invasivo<sup>2-10</sup> facilitou o estudo da mucosa brônquica na última década, auxiliando na identificação de fenótipos de asma eosinofílica e não-eosinofílica. Em adultos a asma eosinofílica, conhecida como “asma clássica”, mostra-se fortemente associada à atopia e a uma resposta ao tratamento com corticóides.<sup>11,12</sup> Já a asma não-eosinofílica, fenótipo identificado nos últimos anos, parece cursar com uma maior concentração de neutrófilos e ausência de eosinofilia no escarro, apresentando uma pobre resposta à corticoterapia.<sup>13,14</sup>

Os estudos de coorte de nascimento (realizados para identificação da história natural da asma e seus fatores de risco na infância) que foram publicados na última década, aumentaram significativamente o entendimento dos diferentes fenótipos clínicos da doença.<sup>15-17</sup> A maioria das crianças com sibilância nos primeiros anos de vida não persiste com sintomas após os primeiros 5 anos de vida (Sibilantes Transitórios Precoces); uma minoria de crianças persiste sintomática até a vida adulta, e apresenta

---

sintomas de asma ligadas a atopia (Asmáticos Atópicos); um outro grupo de crianças, com quadro clínico mais leve, apresenta asma não ligada a atopia (Asma não-atópica).<sup>15</sup>

Apesar de bem definidos esses fenótipos clínicos de asma na infância, pouco se sabe sobre os padrões inflamatórios predominantes em cada sub-grupo de crianças. A literatura atual ainda é pobre em estudos que caracterizem a inflamação brônquica na população pediátrica. No presente estudo descrevemos as características citológicas do escarro induzido em crianças brasileiras com asma atópica e não-atópica, além de compará-las a um grupo-controle de crianças sem doença respiratória.

---

### 3.3 MÉTODOS

#### População e amostra

De um total de quase 2000 crianças (entre 11 e 15 anos) avaliadas segundo critérios do estudo ISAAC-fase II<sup>18</sup> na cidade de Uruguaiana-RS-Brasil desde o início de 2003, um subgrupo de 1200 crianças (amostra aleatória e representativa) foi submetido a testes cutâneos para alérgenos ambientais comuns.<sup>19</sup> Destas 1200 crianças, 90 foram selecionadas de forma aleatória para participar desse estudo, sendo divididas em três grupos: 30 crianças com asma ativa e teste cutâneo positivo (asma atópica: AA), 30 crianças com asma ativa e teste cutâneo negativo (asma não-atópica: ANA) e 30 crianças sem asma ou sibilância alguma vez na vida e com teste cutâneo negativo (controles, não-asmáticos, não-atópicos, NANA).

Os critérios de exclusão foram a incapacidade de realizar curvas espirométricas (segundo critérios da *American Thoracic Society* - ATS),<sup>20</sup> volume expiratório forçado em um segundo (VEF1) basal inferior a 75% do previsto,<sup>21</sup> idade gestacional ao nascimento inferior a 37 semanas, uso de corticoterapia oral ou inalatória (ou de drogas antiinflamatórias e imunossupressoras) nos últimos 30 dias, diagnóstico de doenças cardíacas, de imunodepressão (imunodeficiências congênitas ou adquiridas, leucemia, linfoma) ou de doenças crônicas de vias aéreas exceto asma (fibrose cística, bronquiolite obliterante, fibrose pulmonar, pneumonias de repetição, doenças intersticiais), história de exacerbação de asma ou de rinite alérgica nos últimos 30 dias e diagnóstico de infecções de vias aéreas (superiores ou inferiores) nos últimos 30 dias.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São Lucas

---

da PUCRS-Porto Alegre-Brasil e os representantes legais das crianças leram e assinaram um consentimento informado.

#### Desenho do estudo

Estudo transversal, de caso-controle.

#### Questionário ISAAC

Todas as crianças haviam respondido no ano de 2003 ao questionário padronizado e pré-validado do estudo ISAAC-fase II,<sup>18,19</sup> sendo o diagnóstico de asma ativa definido pela resposta afirmativa às perguntas “Seu filho/a teve asma alguma vez na vida?” e “Nos últimos 12 meses seu filho/a apresentou chiado (tipo miado ou apito) no peito?”<sup>18</sup> Para o presente estudo as perguntas principais referentes a asma foram repetidas e registradas para confirmação da categorização dos pacientes entre os três grupos estudados.<sup>18,19</sup> Foram também analisadas respostas fornecidas no questionário aplicado em 2003,<sup>19</sup> referentes a fatores de risco para asma (tabagismo, escolaridade e história de asma maternos, história de hospitalização por bronquiolite, número de irmãos). Foi questionado o padrão habitacional, considerando-se como área melhor urbanizada aquelas regiões que apresentavam praças ou parques.

#### Testes cutâneos

---

Todos as crianças incluídas foram submetidas, no estudo de Pereira e colaboradores,<sup>19</sup> a testes cutâneos para seis alérgenos ambientais comuns (*Dermatophagoides pteronissinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Alternaria alternata*, extrato de gramíneas, extrato de árvores e epitélio de gato), utilizando-se lancetas do laboratório ALK-Horsholm-Dinamarca. Histamina 10mg/ml foi utilizada como solução para controle positivo e glicerina, como controle negativo. A criança foi considerada atópica se apresentasse teste positivo a pelo menos um dos alérgenos testados, definido pela presença de uma pápula com diâmetro  $\geq 3$  mm do diâmetro médio do halo do controle negativo.<sup>18</sup>

#### Testes de Função Pulmonar

Espirometrias (espirômetro MicroLab-SuperSpiro<sup>®</sup>) foram realizadas imediatamente antes, durante e após a indução de escarro, conforme critérios da ATS.<sup>20</sup> Antes do início da indução, foram registrados o VEF1 basal e a relação VEF1/CVF e a seguir administrados 200 mcg de salbutamol spray, sendo a espirometria repetida após 10 minutos. O VEF1 pós-salbutamol foi utilizado como critério de segurança para a indução de escarro. A cada cinco minutos de indução, uma espirometria era repetida. Após o término da indução, uma última espirometria era realizada. Crianças com VEF1 basal inferior a 75% do previsto<sup>21</sup> ou com queda persistente do VEF1 além de 15 % do valor obtido após o uso de salbutamol spray deveriam ser excluídas do estudo. As crianças só foram liberadas se após o término do exame apresentassem um VEF1 de pelo menos 90% do valor basal obtido antes do início da indução de escarro.

### Indução de escarro

Os pesquisadores foram submetidos em dezembro de 2005 a um treinamento para indução do escarro no Núcleo de Pesquisas em Asma e Infecções de Vias Aéreas da Universidade Federal de Santa Catarina (NUPAIVA-UFSC-Florianópolis-SC), centro de referência para pesquisas com escarro induzido no Brasil. Após este período foi realizado um teste piloto com indução e processamento do escarro nos próprios pesquisadores, entre janeiro e março de 2006. Confirmada a realização adequada do exame, procedeu-se à coleta de dados.

O escarro foi induzido no Laboratório Biosul, na cidade de Uruguaiana-RS, através de nebulizações com solução salina a 4.5% e segundo protocolo modificado de Pin e colaboradores.<sup>8</sup> Foi utilizado um nebulizador ultrassônico dosimetrado da marca ULTRA-NEB DeVilbiss – 2000<sup>®</sup> num débito de 1 ml/min, que produz partículas com um diâmetro aerodinâmico mediano de 0.5 a 5 µm.

Todas as crianças foram submetidas ao período total de 20 minutos de exposição à solução salina hipertônica (quatro períodos de cinco minutos, sendo entre cada período repetido o VEF1 e encorajado a criança a tossir). O exame foi antes interrompido apenas no caso de queda do VEF1 além de 15% do valor pós-salbutamol, piora clínica (tosse intensa, dispnéia, sensação de opressão torácica) ou desistência do paciente.

---

### Processamento do escarro

O escarro foi processado em um período máximo de duas horas após o término da indução. Enquanto aguardavam o processamento, as amostras ficavam refrigeradas a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Foi empregado um protocolo modificado do descrito por Pizzichini colaboradores.<sup>2</sup> Em resumo, o escarro era selecionado da saliva a olho nú (sem o auxílio de um microscópio invertido) e então depositado em um tubo de poliestireno de 15 ml (tubo de Falcon<sup>®</sup>), onde era tratado com ditioneitol (DTT) a 0.1% (Sputolysin 10%<sup>®</sup>, Calbiochem Corp, San Diego, CA) em quatro vezes o seu volume, misturando-se delicadamente o conteúdo com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

O tubo de poliestireno era colocado em um agitador de mesa (3D Rocking Platform STR9<sup>®</sup>), sendo seu conteúdo homogeneizado por mais 30 minutos. Após este período, adicionava-se PBS (Phosphate buffered saline), também em quatro vezes o volume inicial do escarro, seguido por mais cinco minutos de homogeneização. A suspensão resultante era filtrada através de um filtro de nylon (Millipore<sup>®</sup> 60  $\mu\text{m}$ ). Parte desta suspensão era utilizada para cálculo da contagem total de células (TCC, expressa na unidade  $\times 10^6/\text{ml}$ ) e também da viabilidade celular (através do método de exclusão do Azul de Tripán). O volume restante era centrifugado e o sobrenadante armazenado em um tubo de Eppendorf a  $-80^{\circ}\text{C}$  (este material será utilizado para futura dosagem de citocinas inflamatórias). O precipitado era resuspenso em PBS e homogeneizado até que estivesse completamente disperso no PBS. Setenta a 80  $\mu\text{L}$  desta suspensão (ajustada para  $1,0 \times 10^6$  células/ml) eram colocados em cada citospina

---

(Eppendorf Citocentrifuge 5417C<sup>®</sup>), sendo cetrifugados a 500 r.p.m. por 5 minutos. Quatro citospinas codificadas foram preparadas para cada criança, sendo fixadas com metanol e coradas pelo método de May-Grumwald-Giemsa.

Foram contadas 400 células não-escamosas e o citológico diferencial foi expresso pela percentagem de cada variável (eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células broncoepiteliais) sobre as 400 células contadas. Só foram aceitas amostras de escarro com viabilidade celular superior a 50% e menos de 20% de células escamosas. Apenas o pesquisador principal tinha conhecimento da classificação dos pacientes e este não interferiu na análise citológica do material.

O escarro foi considerado eosinofílico se apresentasse uma concentração de eosinófilos igual ou superior a 3%, com base nos valores normais relatados por Belda e colaboradores.<sup>4</sup> Crianças com asma ativa e sem evidência de eosinofilia no escarro foram consideradas como portadoras de uma inflamação não-eosinofílica.

#### Análise estatística

As variáveis categóricas (gênero, escolaridade materna superior a 8 anos, mãe fumante, história materna de asma, morador em área melhor urbanizada, hospitalização por bronquiolite, número de irmãos igual ou superior a 1 e percentagem de eosinófilos no escarro  $\geq 3\%$ ) foram apresentadas através de frequência absoluta e percentagens e analisadas por meio do teste de Qui-quadrado. O teste de Qui-quadrado foi aceito com um número inferior a cinco crianças em no máximo 50% as caselas analisadas.

As variáveis contínuas com distribuição normal (idade, VEF1 basal, VEF1/CVF

---

e VEF1 pós-salbutamol) foram expressas em média, desvio padrão e valor mínimo e máximo. A comparação entre estas variáveis foi realizada por meio dos testes de ANOVA e Bonferroni. As variáveis contínuas com distribuição não-Gausseana (contagem total de células, percentagem de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos no escarro) foram expressas em mediana, intervalo interquartil e valor máximo e mínimo. Para que estas variáveis pudessem ser comparadas através de um teste paramétrico, as mesmas foram expressas na forma exponencial de  $\log^{10}$ . Todas as variáveis contínuas foram comparadas através dos testes de ANOVA e Bonferroni.

Os programas empregados foram o SPSS versão 13.0 e o Excel 2003. Não foi realizado cálculo de tamanho de amostra, uma vez que não dispúnha-mos de dados de inflamação brônquica na população brasileira. O número de crianças foi determinado segundo revisão de literatura.

---

### 3.4 RESULTADOS

Das 90 crianças sorteadas, setenta e seis concordaram em participar do estudo (84.4%). A indução do escarro e a aplicação do questionário ocorreram entre abril e setembro de 2006. Destas 76 crianças que aceitaram fazer o exame, 21 (7 AA, 8 ANA e 6 NANA) não conseguiram amostras adequadas de escarro, sendo que 12 (5 AA, 4 ANA e 3 NANA) não conseguiram nenhuma amostra e nove (2 AA, 4 ANA e 3 NANA) obtiveram amostras insuficientes (i.e. > 20% de células escamosas). Não houve diferenças significativas entre os três grupos quanto a essas perdas.

Cinquenta e cinco crianças obtiveram uma amostra adequada de escarro, sendo o índice de sucesso da indução 72.4% (55/76). A média de idade nos 55 pacientes foi de 13 anos (11,9 a 14,7 anos), sendo 27 (49%) do sexo masculino. As características demográficas e fenotípicas dos três grupos estudados encontram-se listados na tabela 1.

O questionário aplicado no presente estudo demonstrou uma concordância de 92% (70/76), quando comparado às respostas fornecidas às mesmas perguntas do questionário aplicado em 2003.<sup>19</sup> Respostas discordantes foram observadas em apenas seis (7.9%) questionários.

As características fenotípicas consideradas na tabela 1 (escolaridade materna superior a 8 anos, mãe fumante, história materna de asma, morador de área melhor urbanizada, história de hospitalização por bronquiolite e número de irmãos igual ou superior a 1) foram coletadas pelo questionário do estudo ISAAC em 2003. Nos AA observou-se um maior número de moradores de áreas melhor urbanizadas e de mães com maior escolaridade. Além disso, a história materna de asma é significativamente

---

maior neste grupo. As crianças do grupo dos ANA apresentaram com maior frequência um número de irmãos igual ou superior a 1.

**Tabela 1 – Características demográficas e fenotípicas da amostra estudada (n = 55)**

Características	AA (n=21)	ANA (n=21)	NANA (n=13)
Idade em anos (média±DP)	12.93±0.77	13.01±0.66	13.00±0.72
Gênero masculino (n, %)	12 (57.1)	10 (47.6)	5 (38.5)
Mãe fumante (n, %)	7 (33.3)	6 (28.6)	5 (38.5)
História materna de asma (n, %)	3 (14.3) <sup>†</sup>	2 (9.5)	1 (7.7)
Escolaridade materna >8 anos (n, %)	4 (19) <sup>†</sup>	2 (9.5)	1 (7.7)
Morador área melhor urbanizada (n, %)	3 (14.3) <sup>†</sup>	2 (9.5)	1 (7.7)
Hospitalização por bronquiolite (n, %)	3 (14.3)	3 (14.3)	0 (0) <sup>††</sup>
Coabitação com irmãos ≥ 1 ano (n, %)	14 (66.7)	19 (90.5) <sup>†††</sup>	10 (76.9)

AA = asma atópica; ANA = asma não-atópica; NANA = controles

† = diferença significativa se comparado a ANA e NANA, p<0.05

†† = diferença significativa se comparado a AA e ANA, p<0.05

††† = diferença significativa se comparado a AA e NANA, p<0.05

x = média; DP = desvio padrão; Anova-Bonferroni para variáveis contínuas, Qui-quadrado para as categóricas.

O período total de nebulização com solução salina a 4.5 % foi de 20 min e o processamento foi iniciado em um prazo máximo de 2 h em todos os pacientes.

Todas crianças apresentaram-se estáveis, sem distúrbio ventilatório grave detectável pela espirometria e ninguém apresentou piora da função pulmonar durante o exame. As médias de VEF1 antes do uso de salbutamol spray (VEF1 basal) e após o uso do mesmo (VEF1 pós-salbutamol), assim como a relação VEF1/CVF antes do uso de salbutamol, encontram-se representadas na tabela 2. O VEF1 basal foi significativamente menor no grupo dos AA, quando comparado ao grupo controle (NANA, p<0.05). A relação VEF1/CVF foi significativamente menor nos grupos dos AA e dos ANA, quando comparados ao grupo dos NANA (p<0.001). A medida de VEF1 pós-salbutamol foi semelhante nos três grupos.

<b>Função pulmonar</b>	<b>AA (n = 21)</b>	<b>ANA (n = 21)</b>	<b>NANA (n = 13)</b>
VEF1 basal	92.6 (5.5) <sup>†</sup>	93.9 (4.8)	96.8 (3.9)
VEF1/CVF	81.9 (3.3) <sup>††</sup>	82.3 (3.8) <sup>††</sup>	87.5 (5.2)
VEF1pós-salbutamol	94.6 (3.9)	95.2 (3.9)	97.1 (2.3)

AA = asma atópica; ANA = asma não-atópica; NANA = controles

Variáveis expressas em média  $\pm$  desvio padrão. Utilizado ANOVA-Bonferroni.

<sup>†</sup> Diferença significativa comparado a NANA,  $p < 0.05$

<sup>††</sup> Diferença significativa comparado a NANA,  $p < 0.001$

As variáveis citológicas analisadas foram a contagem total de células (TCC), a percentagem de eosinófilos, de neutrófilos e de macrófagos nas 400 células não-escamosas contadas. Os dados são demonstrados na Tabela 3. Uma quinta variável foi analisada, estratificando-se a concentração de eosinófilos em duas categorias:  $<3\%$  e  $\geq 3\%$ . Crianças com eosinofilia no escarro (concentração de eosinófilos  $\geq 3\%$ ) foram classificadas como tendo uma inflamação eosinofílica. A inflamação nas crianças com asma ativa e sem eosinofilia no escarro foi classificada como não-eosinofílica. Estes dados estão também descritos na Tabela 3.

**Tabela 3 – Características citológicas do escarro induzido, expressas em mediana e intervalo interquartil, valor mínimo e valor máximo\***

Citología	AA (n = 21)	ANA (n = 21)	NANA (n = 13)
TCC (x10 <sup>6</sup> /ml)	3.4 (2.7)	4 (3)	2.2 (1.4)
	1.2-13	1.5-7.6	1.8-8
Eosinófilos (%)	9 (14) <sup>†</sup>	1 (2)	0.5 (1)
	0-64	0-66	0-2
Neutrófilos (%)	11 (2)	18 (5.6) <sup>†††</sup>	13 (7)
	0-16	7-31	8-22
Macrófagos (%)	76.4 (11)	78 (8)	81 (6)
	29-86	24-84	74-87
Eosinófilos ≥ 3% **	17/21 (81) <sup>††</sup>	5/21 (23.8)	0/13 (0)
Inflamação não-eosinofílica **	4/21 (19)	16/21 (76.2) <sup>†††</sup>	0

\* Exceto nas variáveis Eosinófilos ≥ 3% e Inflamação não-eosinofílica, expressas em n (%)

\*\* Variável categórica, utilizado Qui-quadrado. Nas demais variáveis, utilizado ANOVA-Bonferroni.

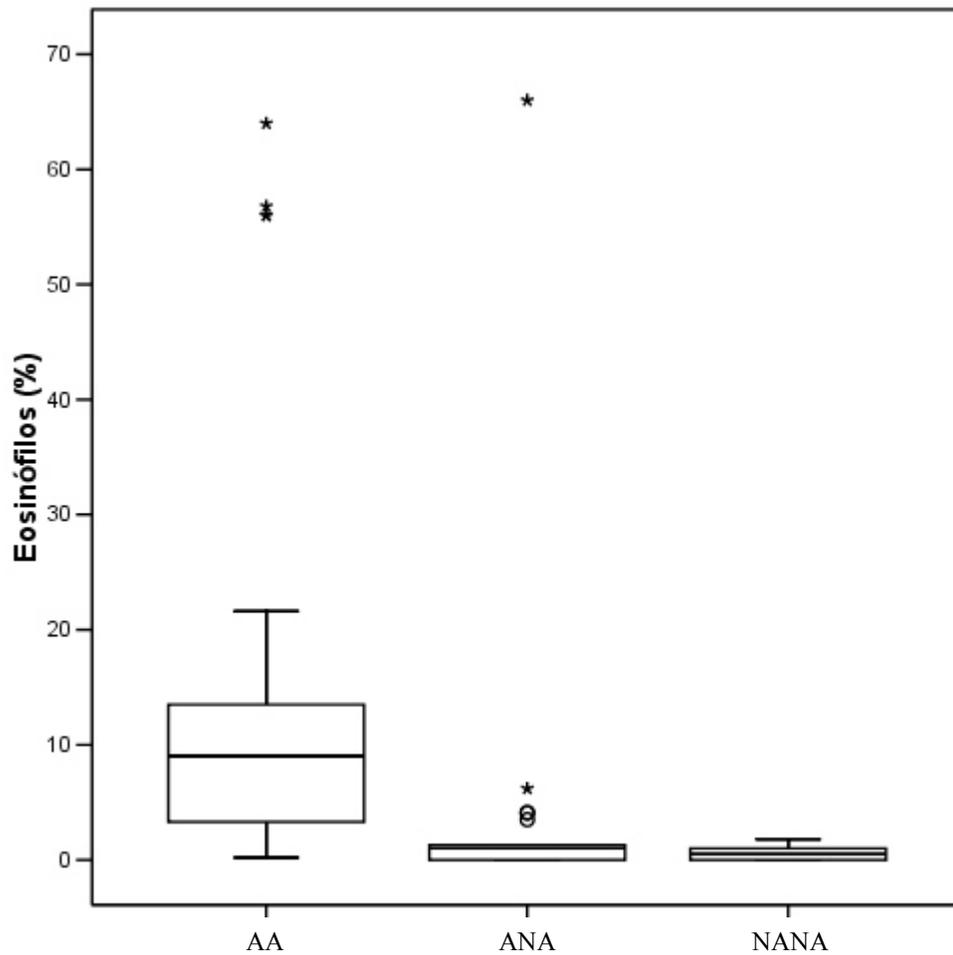
† Diferença significativa comparado a ANA e NANA, p<0.001

†† Diferença significativa comparado a ANA e NANA, p<0.001

††† Diferença significativa comparado a AA e NANA, p<0.001

AA = asma atópica; ANA = asma não-atópica; NANA = controles

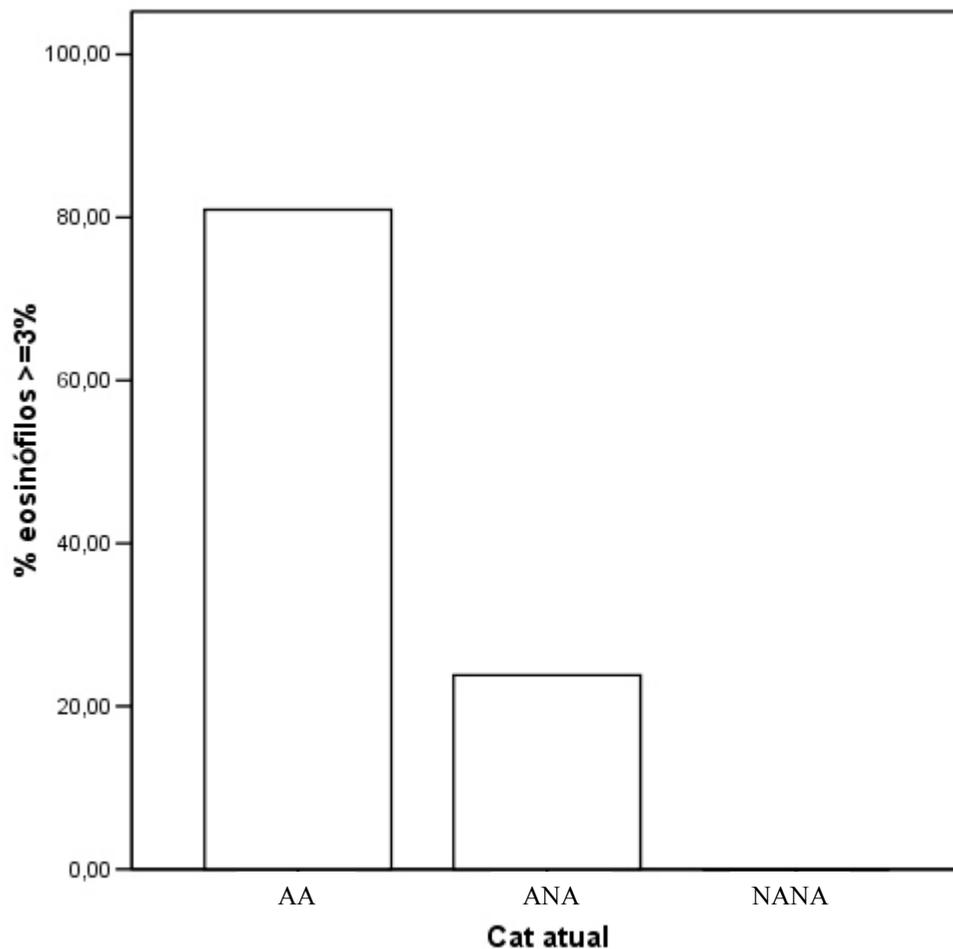
A distribuição da percentagem de eosinófilos (Tabela 3 e Figura 1) foi significativamente maior no escarro das crianças do grupo dos AA (p<0.001).



**Figura 1 - Concentração de eosinófilos, expressa em mediana**

AA = asma atópica; ANA = asma não-atópica; NANA = controles

O número de crianças com inflamação eosinofílica (Figura 2) foi também significativamente maior nos AA.



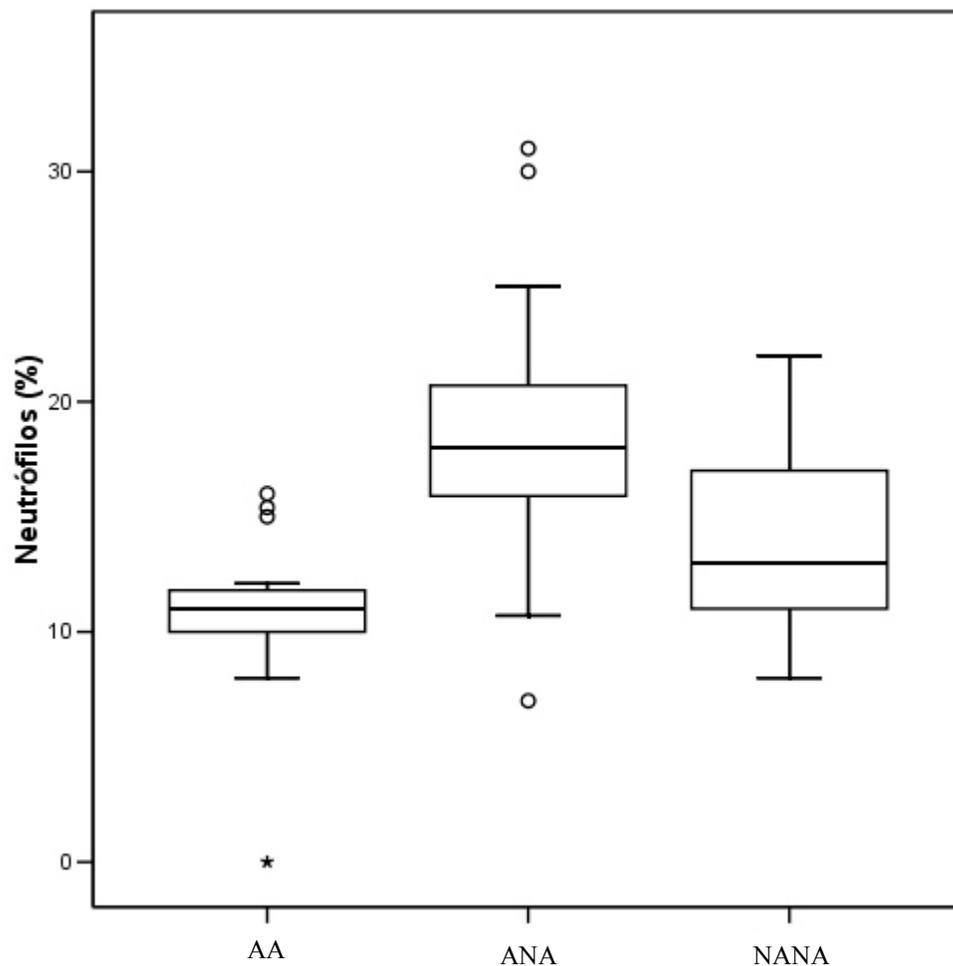
**Figura 2** – Eosinofilia no escarro induzido

AA = asma atópica; ANA = asma não-atópica; NANA = controles

Oitenta e um % (17/21) dos AA apresentaram uma inflamação eosinofílica, o que foi encontrado em apenas 23.8 (5/21) dos ANA ( $p < 0.001$ , Tabela 3). Nenhuma criança do grupo-controle apresentou inflamação eosinofílica. A maioria das crianças do grupo dos ANA (16/21, 76.2%) apresentou uma inflamação não-eosinofílica e esta frequência foi estatisticamente superior quando comparado aos grupos de AA e NANA ( $p < 0.001$ ). Estes dados estão representados na Tabela 3. Dentre as crianças com asma ativa (grupos

AA e ANA), 20 apresentaram uma inflamação não-eosinofílica, sendo a grande maioria do grupo dos ANA (16/20, 80%).

A contagem total de células (TCC), a percentagem de macrófagos e a percentagem de neutrófilos foram semelhantes nos três grupos estudados. (Tabela 3 e Figura 3).



**Figura 3** - Concentração de neutrófilos, expressa em mediana

AA = asma atópica; ANA = asma não-atópica; NANA = controles

### **3.5 DISCUSSÃO**

Este estudo é o primeiro a relacionar as características fenotípicas da asma com os achados de inflamação brônquica em crianças brasileiras, através da técnica do escarro induzido. As crianças foram estratificadas de forma aleatória em três grupos (asma atópica, asma não-atópica e controles sem doença respiratória), baseado em respostas ao questionário ISAAC-fase II e nos resultados de testes cutâneos.

Nossa hipótese inicial era de que crianças com asma atópica apresentariam uma inflamação predominantemente eosinofílica e que este achado não estaria presente naquelas com asma não-atópica. Além disso, hipotetizamos que a asma não-atópica estaria associada com uma inflamação neutrofílica.

O principal achado de nosso estudo consiste na confirmação do predomínio de uma inflamação eosinofílica nas amostras de escarro induzido das crianças com asma atópica. Nossos dados demonstraram um aumento significativo na concentração de eosinófilos neste grupo, quando comparado aos asmáticos não-atópicos e também ao grupo controle. Mais de 80% das crianças com asma atópica apresentou uma concentração de eosinófilos igual ou superior a 3%, níveis considerados elevados e utilizados como critério de eosinofilia no escarro induzido.<sup>4,22</sup> Esta eosinofilia foi encontrada em apenas 23.8% das crianças com asma não-atópica e não foi observada em nenhuma criança do grupo-controle.

Nossos achados combinam com os dados descritos previamente em populações de adultos. Sabe-se que a asma atópica em adultos apresenta-se diretamente relacionada ao estímulo de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento e ativação de

---

eosinófilos nas vias aéreas.<sup>14</sup> Conseqüentemente, concentrações elevadas de eosinófilos são observadas no escarro de asmáticos atópicos.<sup>8,23,24</sup>

Nas crianças, ainda são poucos os estudos desenvolvidos dentro dessa linha de pesquisa, mas há fortes evidências de que a asma atópica também apresente essa inflamação eosinofílica e os dados apresentados no nosso estudo fortalecem esta hipótese. Nossos achados estão de acordo com os poucos estudos realizados até o momento na população pediátrica. Um grupo de pesquisadores australianos publicou em 1998 um estudo longitudinal descrevendo associações epidemiológicas entre inflamação de via aérea, sintomas de asma e hiperresponsividade brônquica. Dentre as crianças com hiperresponsividade brônquica, a maioria era atópica e apresentava uma maior concentração de eosinófilos no escarro induzido.<sup>9</sup> Outro estudo, publicado em 2004, também mostra uma inflamação eosinofílica em crianças com asma atópica, onde a concentração de eosinófilos se mostrou significativamente superior do que nas crianças sem atopia.<sup>25</sup>

As crianças com quadro clínico de asma ligada à atopia apresentam um padrão de doença mais persistente e grave,<sup>15</sup> portanto a identificação de eosinofilia no escarro oferece um potencial diagnóstico e de auxílio terapêutico enorme. Nossos achados são muito significativos, pois a definição fenotípica da asma baseada em dados de estudos epidemiológicos como o ISAAC, foi aqui validada e documentada através de dados laboratoriais objetivos. Crianças classificadas pelo ISAAC como asmáticos atópicos apresentaram no escarro uma inflamação eosinofílica, o que condiz com a definição de que neste fenótipo ocorre uma maior ativação de eosinófilos na mucosa brônquica. Outra observação importante reside no fato de que essa inflamação eosinofílica foi evidenciada

---

mesmo estando essas crianças estáveis e assintomáticas. Isto vai ao encontro do conceito já utilizado em adultos, de que uma inflamação de vias aéreas existe em todos os casos de asma, inclusive naqueles estáveis e mais leves.<sup>1</sup>

Além disso, reforça a importância da monitorização da inflamação brônquica mesmo nos pacientes com a asma aparentemente controlada. Sabe-se que a identificação dos níveis de eosinófilos no escarro é útil no manejo terapêutico da asma (na decisão entre usar ou não terapias com corticóides, assim como no auxílio ao emprego de doses adequadas destes medicamentos).<sup>11,12,24</sup> Postula-se ainda que exacerbações de asma possam ser preditas pelo aumento dessas células no escarro induzido.<sup>24</sup> Desta forma, a adoção de terapias que mantenham concentrações estáveis e reduzidas de eosinófilos no escarro poderia evitar exacerbações da asma.<sup>13,24,26</sup> Todas essas considerações chamam a atenção para a importância da análise das características inflamatórias das vias aéreas por meio de uma técnica não-invasiva como o escarro induzido e também para o valor da contínua monitorização do padrão inflamatório de cada paciente. A maioria dos estudos aqui referenciados foram realizados entre asmáticos adultos, portanto há ainda um campo enorme a ser desenvolvido na Pediatria.

Analisando as crianças com asma não-atópica incluídas em nosso estudo, observamos que a grande maioria não apresentou uma inflamação eosinofílica. Neste grupo foi encontrado um aumento significativo dos níveis de neutrófilos. O grupo-controle apresentou uma concentração mediana de neutrófilos igual a 13%. Nos asmáticos não-atópicos a mediana foi de 18% e nos asmáticos atópicos, 11%. Apesar dos níveis de neutrófilos encontrados nos três grupos poderem ser considerados normais por alguns pesquisadores, essa maior proporção de neutrófilos nos asmáticos não-

---

atópicos foi significativa quando comparada aos asmáticos atópicos e também ao grupo-controle.

Ainda não existe uma validação para a concentração normal de neutrófilos em amostras obtidas por escarro induzido. Essa concentração pode apresentar uma variação muito grande, podendo ser tão baixa quanto 17% e tão alta quanto 78.8%.<sup>3,4,22,27</sup> Talvez isto seja consequência dos vários fatores que influenciam na distribuição neutrofilica, tal como a poluição atmosférica, as infecções de vias aéreas, as exacerbações de asma e a idade do paciente.<sup>14,27</sup>

Thomas e colaboradores demonstraram que a concentração normal de neutrófilos no escarro induzido está diretamente relacionada com a idade: quanto menor a idade, menor a concentração dessas células. Adultos com idade média de 60 anos apresentaram concentrações médias de 68.5% (desvio padrão 20,6%) de neutrófilos, enquanto adolescentes com idade média de 18 anos obtiveram concentrações menores, com média de 26.9% (desvio padrão de 19,8%).<sup>27</sup>

Em nosso estudo foram incluídas crianças com média de idade ainda menor que no estudo de Thomas e colaboradores,<sup>27</sup> o que justifica uma proporção de neutrófilos mais baixa. Além disso, tomamos o cuidado de não incluir crianças com infecções agudas de vias aéreas (fossem elas virais ou bacterianas) ou em exacerbação de asma (situações que parecem estar associadas a um aumento da neutrofilia no escarro induzido).<sup>14,27,28</sup> O grande fator desencadeante de exacerbações de asma em crianças é justamente a infecção por vírus respiratórios, a qual estimula a liberação de citocinas inflamatórias que parecem ser responsáveis pela ativação dos neutrófilos na mucosa

---

brônquica.<sup>14</sup> Nossas crianças estavam clinicamente assintomáticas e sem a ação de agressores virais ou bacterianos no momento da indução do escarro, e isso pode explicar o fato de não termos observado proporções anormalmente elevadas de neutrófilos. Mesmo assim, conseguimos evidenciar um aumento significativo dessas células no escarro das crianças com asma não-atópica. Pode ser que a expressão dessa inflamação neutrofílica em crianças com asma não-atópica/não-eosinofílica possa ser ainda melhor documentada nos períodos de exacerbação da doença.

Dowes e colaboradores publicaram uma revisão sobre os possíveis mecanismos da asma não-eosinofílica em crianças e adultos. A expressão da inflamação não-eosinofílica parece estar realmente associada a uma maior liberação de neutrófilos na mucosa brônquica, semelhante ao que se observa em pacientes com asma ocupacional.<sup>14</sup> A mobilização dos neutrófilos parece ser consequência da ação de fatores externos (poluição atmosférica, endotoxinas bacterianas e agressões virais) que estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias específicas (como a interleucina 8) responsáveis pela infiltração e ativação dos neutrófilos nas vias aéreas.<sup>14</sup> Outro estudo, recentemente publicado por Simpson e colaboradores, vai ao encontro das observações descritas acima e defende que os neutrófilos apresentam implicações importantes na investigação e caracterização da inflamação de vias aéreas na asma.<sup>23</sup>

Portanto, a avaliação das citocinas envolvidas na fisiopatogenia da asma não-eosinofílica e sua relação com a ativação de neutrófilos parece ser a chave para a compreensão desse fenótipo: principalmente em crianças, onde essa provável associação com uma neutrofilia no escarro nem sempre consegue ser documentada. Mais estudos na linha pediátrica são necessários para elucidar qual o verdadeiro mecanismo e quais os

---

---

agentes inflamatórios associados ao fenótipo de asma não-eosinofílica. Apesar de aceita sua associação com uma inflamação neutrofílica de vias aéreas inferiores, os mecanismos envolvidos devem ainda ser melhor esclarecidos e comprovados.

Uma boa parte dos estudos com inflamação brônquica e asma apresenta testes de broncoprovocação em seus protocolos. Nós não realizamos estes testes, o que pode ser apontado por alguns leitores como uma limitação para um adequado diagnóstico de asma. Entretanto, a classificação das crianças por dados do questionário do ISAAC (validado e mundialmente aceito),<sup>18</sup> juntamente com a afirmativa de que essas crianças apresentavam-se estáveis e tinham história de asma leve (o que pode justificar as espirometrias normais no momento da coleta de dados), dá credibilidade ao diagnóstico da doença e à estratificação entre os três grupos estudados. Há relatos de que a hiperresponsividade brônquica apresenta forte associação com a asma eosinofílica, mas está menos associada e algumas vezes até inexistente na asma não-eosinofílica.<sup>14</sup> Logo, os resultados dos testes de broncoprovocação poderiam ser normais nesse grupo de pacientes, e essa normalidade não afastaria, em crianças, o diagnóstico de asma.

Um dado interessante a ser documentado, e que contribui ainda mais para o reconhecimento do questionário do estudo ISAAC como bom classificador de subtipos de asma, consiste na comparação de variáveis epidemiológicas desse questionário entre os três grupos estudados. No nosso grupo de asmáticos atópicos, a escolaridade materna foi significativamente maior, além de este grupo morar em áreas melhor urbanizadas. Isso condiz com a literatura, a qual defende que pacientes com asma atópica apresentam melhores condições sócio-econômicas, quando comparados a pacientes com asma não-atópica e a pessoas sem asma.<sup>15-17</sup>

---

Outra consideração importante em nosso estudo é a utilização do escarro induzido. No Brasil ainda há poucos grupos empregando este método na avaliação da inflamação brônquica, menos ainda na população pediátrica. Considerando as particularidades técnicas da indução e do processamento do escarro, obtivemos uma taxa de sucesso de 72%. Outros estudos utilizando escarro induzido demonstraram sucesso de 56% a 95%,<sup>5,10,28</sup> sendo as maiores taxas obtidas com o uso de nebulizadores ultrassônicos e de um microscópio invertido para selecionar o escarro da saliva.<sup>10,29</sup> No nosso estudo não dispusemos de um microscópio invertido: a seleção do escarro foi feita a “olho nu”, tornando mais difícil a separação da saliva e, conseqüentemente, uma maior concentração de células escamosas foi encontrada em algumas crianças. Nove das 76 crianças que aceitaram submeter-se ao exame apresentaram amostras com concentrações inaceitáveis dessas células<sup>29</sup> e, por isso, não foram incluídas na análise. Se dispuséssemos de um microscópio invertido, talvez as amostras dessas nove crianças pudessem ter sido aproveitadas, tornando ainda maior nossa taxa de sucesso de indução e processamento do escarro.

Concluindo, avaliamos amostras da mucosa brônquica por meio da técnica do escarro induzido e pudemos demonstrar que crianças com asma atópica, assim como ocorre em adultos, apresentam uma inflamação predominantemente eosinofílica. Nos asmáticos não-atópicos, a inflamação eosinofílica se mostrou menos comum, sendo neste grupo observado um aumento significativo na proporção de neutrófilos. A contribuição dos neutrófilos na asma não-atópica e não-eosinofílica em crianças ainda permanece indefinida. Mais estudos fazem-se necessários dentro dessa linha de pesquisa, a fim de elucidar os mecanismos que exercem influência sobre a inflamação

brônquica (principalmente a não-eosinofílica) entre os diferentes fenótipos de asma na população pediátrica.

---

---

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:893-910.
  2. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproductibility and validity of and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Aug;154(2 Pt 1):308-17.
  3. Spanevello A, Confaloniere M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Sep;162(3 Pt 1):1172-4.
  4. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE, et al. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Feb;161(2 Pt 1):475-8.
  5. Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, Silverman M. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax* 2000 Sep;55(9):768-74.
  6. Kips JC, Inman MD, Jayaram L, Bel EH, Parameswaran K, Pizzichini MMM, et al. The use of induced sputum in clinical trials. *Eur Respir J* 2002;20:47s-50s
  7. Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, et al. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J* 2002;20:40s-43s.
  8. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-9.
  9. Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, et al. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and
-

- 
- airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:36-41.
10. Jones PD, Hankin R, Simpson J, Gibson PG, Henry RL. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(7):1146-9.
  11. Deykin A, Lazarus SC, Fahy JV, Wechsler ME, Boushey HA, Chinchilli VM, et al. Sputum eosinophil counts predict asthma control after discontinuation of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2005 Apr;115(4):720-7.
  12. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, et al. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 May;171(10):1077-82.
  13. Green RH, Brighling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding PI, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophils counts: a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-21.
  14. Douwes J, Gibson PG, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002;57:643-8.
  15. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life: relation with lung function, total serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.
  16. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, et al. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003;349:1414-22.
-

17. Oswald H, Phelan PD, Lanigan A, Hibbert M, Bowers G, Olinski A. Outcome of childhood asthma in mid-adult life. *BMJ* 1994;309:95-6.
  18. Weiland SK, Bjorksten B, Brunekreef B, Cookson WO, von Mutius E, Strachan DP. Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods. *Eur Respir J* 2004;24(3):406-12.
  19. Pereira MU. A relação de fatores de risco ambientais e familiares com sibilância em escolares da cidade de Uruguaiana, RS. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da PUCRS, área de concentração em Pediatria. 2005.
  20. American Thoracic Society. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1202-18.
  21. Polgar CPV. Standart values. In: *Pulmonary function testing in children: techniques and standards*. Saunders W, editor. Philadelphia;1971.87-122p.
  22. Sozanska E, Gasior G, Semik A, Barczuk A, Purzchala W. Range in the normal values for induced sputum cells in Silesian population. *Pneumol Alergol Pol* 2005;73(2):148-52.
  23. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006 Jan;11(1):54-61.
  24. Bacci E, Cianchetti S, Bartoli M, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, et al. Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest* 2006;129:565-72.
  25. Ryttila P, Pelkonen AS, Metson T, Nikander K, Haahtela T, Turpeinen M. Induced sputum in children with newly diagnosed mild asthma: the effect of 6 month of treatment with budesonide or disodium cromoglicate. *Allergy* 2004 Aug;59(8):839-44.
-

- 
26. Jayaram L, Pizzichini MM, Cock RJ, Boulet LP, Lemiere C, Pizzichini E, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006;27:483-94.
  27. Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw Aj, et al. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest* 2005 Dec;128(6):4049-50.
  28. Palomino ALM, Bussambra MHCF, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Nunes MPT, Rodrigues JC, et al. Escarro induzido em crianças e adolescentes com asma: segurança, aplicabilidade clínica e perfil de células inflamatórias em pacientes estáveis e durante exacerbação. *J Pediatr (Rio J)* 2005;81(3):216-24.
  29. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996;9:1174-80.
-

### **3.7 CARTA DE SUBMISSÃO**

Características citológicas do escarro induzido em crianças com asma atópica e não-atópica no Sul do Brasil

#### **Declaração**

Os autores deste trabalho declaram que

- a) o artigo é original;
- b) nunca foi publicado e, caso seja aceito pelo Jornal de Pediatria, não será publicado em outra revista;
- c) este artigo não foi enviado a outra revista e não o será enquanto sua publicação estiver sendo considerada pelo Jornal de Pediatria;
- d) todos os co-autores do trabalho leram e aprovaram sua versão final;
- e) não foram omitidas informações quanto a possíveis conflitos de interesses;
- f) todas as pessoas que fizeram contribuições substanciais para o artigo, mas não preencheram os critérios de autoria, são citadas nos agradecimentos, para o que fornecem autorização por escrito, e reconhecem que a Sociedade Brasileira de Pediatria passa a ter os direitos autorais, caso o artigo venha a ser publicado.

Atenciosamente,

Anna Cláudia Drews

Renato Tetelbom Stein

---

---

## **CAPÍTULO IV**

## **CONCLUSÕES**

---

## CONCLUSÕES

1. A concentração de eosinófilos é significativamente maior nas crianças com asma atópica, quando comparado às com asma não-atópica e às do grupo-controle.
  2. Crianças com asma atópica apresentam uma inflamação predominantemente eosinofílica.
  3. Nenhuma criança do grupo-controle (sem asma e sem atopia) apresentou eosinofilia no escarro induzido.
  4. Crianças com asma não-atópica apresentam uma maior proporção de neutrófilos nas amostras de escarro induzido, quando comparado às com asma atópica e ao grupo-controle.
-

---

## **CAPÍTULO V**

### **1. ARTIGO DE REVISÃO SOBRE ESCARRO INDUZIDO**

---

**1. ARTIGO DE REVISÃO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA  
SCIENTIA MÉDICA**

**Uso do escarro induzido na avaliação da inflamação de via aérea em  
pacientes com asma**

**The use of induced sputum to evaluate airway inflammation in patients  
with asthma**

Autores: Anna C. Drews<sup>1</sup>, Daniele C. Escouto<sup>2</sup>, Renato T. Stein<sup>3</sup>

1. Pediatra, especialização em Pneumologia Pediátrica pelo Hospital São Lucas da PUCRS. Mestranda em Pediatria e Ciências da Saúde, Hospital São Lucas da PUCRS
  2. Acadêmica da Faculdade de Medicina da PUCRS, bolsista do CNPq
  3. Pneumologista Pediátrico, Doutor em Pediatria pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre, chefe do departamento de Pneumologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS, professor da faculdade de Medicina da PUCRS.
-

**Resumo**

**Objetivo:** descrever a utilidade e a segurança do escarro induzido, chamando atenção para as vantagens e a importância desta técnica na pesquisa clínica em asma.

**Fonte de dados:** banco de dados Pubmed (1985 a 2005)

**Síntese de dados:** a identificação do padrão inflamatório da mucosa brônquica por meio do escarro induzido tem ajudado desde a última década no diagnóstico e melhor entendimento da asma. É um método não invasivo, acurado e seguro, inclusive em crianças. O sucesso do exame depende do treinamento da equipe e de adequada validação do método. A monitoração da concentração de eosinófilos no escarro ajuda a prever resposta à corticoterapia e auxilia na retirada deste, além de contribuir no diagnóstico de asma ocupacional. Fenótipos de asma não eosinofílica foram também identificados. Estudos epidemiológicos que utilizem a indução de escarro poderão encontrar relações entre fatores de risco distintos e características inflamatórias.

**Conclusão:** o escarro induzido viabiliza a análise das características inflamatórias da via aérea inferior de forma não invasiva, sendo utilizado amplamente desde a última década. Mostrou-se um método seguro, acurado e viável, mesmo na população pediátrica. Estudos que associem dados epidemiológicos da asma com manifestações inflamatórias da mucosa brônquica podem sucumbir num melhor entendimento da doença.

---

**Abstract**

**Objective:** to describe the utility and safety of induced sputum, calling attention to the advantages and importance of this technique on asthma clinical research.

**Data source:** Pubmed data base (from 1985 to 2005).

**Data synthesis:** the identification of bronchial mucosa inflammatory pattern by induced sputum analysis has been helpful since the last decade on diagnosis and better comprehension of asthma. It is a accurate and safe non-invasive technique, including in children. Test success depends on staff qualification and adequate method validation. Sputum eosinophil count monitorization helps to predict corticosteroid response and withdraw; it also contributes to occupational asthma diagnosis. Non-eosinophilic asthma phenotypes were also identified. Epidemiologic studies using induced sputum might, in the future, find a relation between distinct risk factors and inflammatory features.

**Conclusion:** induced sputum allows the analysis of low airway inflammatory features in a non-invasive procedure that has been widely used over the last decade. It has been proved a safe, accureted and viable method, even in children population. Association studies between asthma epidemiology and bronchial mucosa inflammatory features may lead to a better understanding of the disease.

---

## **Uso do escarro induzido na avaliação da inflamação de via aérea em pacientes com asma**

The use of induced sputum to evaluate airway inflammation in patients with asthma

### **INTRODUÇÃO**

A asma é uma doença multifatorial, influenciada por características genéticas, ambientais, socioeconômicas e culturais. A ação conjunta de todos estes fatores contribuiu para um aumento na prevalência dessa doença<sup>1</sup> e para o surgimento de diferentes fenótipos de asma, com manifestações clínicas variadas. Três fenótipos bem documentados consistem na sibilância transitória, na sibilância não-atópica da criança e de pré-escolares e na sibilância atópica mediada por IgE.<sup>2</sup>

Independente da gravidade da doença e de seu fenótipo, a asma é caracterizada por uma inflamação crônica da mucosa brônquica, acompanhada por uma obstrução variável ao fluxo aéreo.<sup>3</sup> Esta inflamação está presente em todos os tipos da doença, inclusive nos quadros mais leves, envolvendo diferentes células e mediadores, muitos ainda desconhecidos.

Graças a isto, tornou-se necessária uma melhor avaliação das características inflamatórias locais na via aérea. Inicialmente a coleta de células da mucosa brônquica para a avaliação de atividade inflamatória era feita por biópsia pulmonar, método invasivo e de riscos, já que consiste em procedimento cirúrgico. A broncoscopia com lavado broncoalveolar (LBA) surgiu como alternativa menos invasiva, mas foi apenas na

---

última década que o estudo do processo inflamatório das vias aéreas inferiores tornou-se viável através de um exame não invasivo.<sup>4</sup> A indução de escarro por meio de nebulizações com solução salina hipertônica se mostrou método não invasivo, acurado, seguro, de baixo custo, sendo desde o início da década de 90 amplamente utilizado em pesquisas clínicas.<sup>4,5</sup>

O presente estudo tem como objetivo descrever a utilidade e a segurança do escarro induzido (EI), chamando a atenção do leitor para as vantagens e a importância desta técnica na pesquisa clínica em asma.

## **MÉTODOS**

### **Identificação dos estudos:**

O banco de dados Pubmed (de 1985 a 2005) foi utilizado para identificar os estudos. As palavras chaves utilizadas foram: escarro induzido (induced sputum), asma (asthma), solução salina hipertônica (hypertonic saline solution) e inflamação de via aérea (airway inflammation). As referências bibliográficas dos artigos selecionados também foram verificadas para identificar estudos adicionais.

### **Seleção dos estudos:**

Inicialmente foram examinados o título e resumo de cada artigo identificado no banco de dados eletrônico. Os estudos considerados potencialmente relevantes foram

---

---

submetidos a uma leitura detalhada do texto completo, sendo selecionados no caso de demonstrarem resultados relevantes e devidamente analisados. Foram incluídos estudos de revisão, estudos de caso-controle e estudos que tiveram como objetivo descrever a segurança e viabilidade da técnica do escarro induzido. As referências citadas nos estudos selecionados foram também avaliadas por este método.

### **SÍNTESE DE DADOS**

A carência de um exame não invasivo para a coleta de material da mucosa brônquica foi suprida na última década, quando o método da indução de escarro por meio de nebulizações com solução salina hipertônica foi finalmente estandarizado.<sup>4,5</sup> A partir daí vários estudos tem sido publicados demonstrando a validade do método, sua acurácia, eficácia e segurança, inclusive em crianças.<sup>5-9</sup>

A indução do escarro era inicialmente realizada com nebulizadores de baixo fluxo e nebulizadores a jato. A taxa de sucesso era de 76%.<sup>5</sup> O aperfeiçoamento da técnica com o uso de nebulizadores ultrassônicos de alto fluxo contribuiu para um aumento na taxa de sucesso da indução,<sup>5,10,11</sup> chegando a índices de 92%.<sup>11</sup> Além do tipo de nebulizador utilizado, é importante que as concentrações de solução salina sejam utilizadas de acordo com protocolos validados. As concentrações podem variar de 3 a 5%, utilizando-se concentrações crescentes (iniciando em 3% , sendo aumentado progressivamente até 5%),<sup>4, 10, 12</sup> ou pode ser utilizada uma mesma concentração durante todo o período de indução.<sup>11,13</sup>

---

Recomenda-se a utilização de solução salina a 4,5% por ser efetiva, geralmente bem tolerada e disponível comercialmente.<sup>13</sup> Induções com uma mesma concentração de solução salina são tão eficientes quanto induções com aumento progressivo das concentrações da solução (3-5%).<sup>10</sup> Nebulizações com solução salina isotônica (0,9%) também podem ser utilizadas, especialmente em pacientes que estejam em exacerbação de asma ou naqueles com asma grave e que possam não tolerar nebulizações com soluções hipertônicas.<sup>14</sup> Não foi observada diferença na composição celular das amostras de escarro obtidas com solução salina isotônica ou hipertônica. Entretanto, a taxa de sucesso da indução é superior quando se utilizam soluções hipertônicas.<sup>10</sup>

Além do tipo de nebulizador e da concentração de solução salina utilizados, há diferentes métodos para a indução de escarro descritos na literatura, podendo a indução ser realizada isoladamente ou associada à técnica de broncoprovocação com solução salina hipertônica.<sup>11</sup>

#### Indução de escarro (técnica isolada):

Na técnica isolada da indução de escarro administra-se 200 a 400 mcg de salbutamol spray antes do início da indução. O uso de salbutamol é útil na prevenção de broncoconstrição naqueles pacientes com hiperresponsividade brônquica à solução salina hipertônica, o que faz deste método o mais utilizado e recomendado na literatura.<sup>4,8,11,13</sup> Podem ser utilizadas diferentes concentrações de solução salina (0,9 a 5%), com duração de cada nebulização (de 30 segundos a dez minutos) e tempo total de nebulizações (idealmente de 15 a 20 minutos) também variáveis.<sup>4,5,13</sup> Quanto maior o

---

tempo da indução, maior a chance de serem obtidas amostras de vias aéreas mais inferiores.<sup>13</sup>

Espirometrias são realizadas no início do exame (antes e após a administração do broncodilatador) e imediatamente após cada nebulização. O volume expiratório forçado em um segundo (VEF1) é anotado e quedas do VEF1 iguais ou superiores a 20% do valor obtido após a administração de broncodilatador são considerados critério para suspensão da indução. O exame é também encerrado se uma amostra adequada de escarro tiver sido obtida ou se o paciente apresentar piora clínica.<sup>4,5,13</sup>

#### Indução de escarro concomitante à técnica de broncoprovocação com solução salina hipertônica:

Este método tem a vantagem de possibilitar a avaliação da inflamação e da hiperresponsividade de vias aéreas em um mesmo exame, de forma simultânea. Nesta técnica não é administrado broncodilatador antes do início do exame, sendo o mesmo utilizado apenas no caso de piora clínica ou da função pulmonar.<sup>11</sup>

#### Comparação entre indução de escarro (técnica isolada) e indução concomitante à técnica de broncoprovocação com solução salina hipertônica:

Jones e colaboradores publicaram estudo comparando estas duas técnicas, utilizando a solução salina 4,5%.<sup>11</sup> A indução com inalação prévia de broncodilatador (técnica isolada) foi realizada por um tempo total de no máximo onze minutos de nebulizações com solução salina hipertônica (períodos de 1 minuto, dois minutos e dois

---

períodos de 4 minutos). A broncoprovocação com solução salina hipertônica foi realizada por um período de no máximo 15,5 minutos. Foram incluídas neste estudo 235 crianças com asma (53 foram submetidas à indução com inalação prévia de broncodilatador e 182 foram submetidas à técnica associada à broncoprovocação). A taxa de sucesso da indução, com obtenção de uma amostra adequada de escarro, foi de 92% <sup>49/53</sup> no grupo com inalação prévia de broncodilatador e de 70% <sup>127/182</sup> no grupo submetido à técnica associada à broncoprovocação ( $p = 0,03$ ). A indução do escarro foi melhor tolerada na técnica com inalação prévia de broncodilatador. O efeito colateral mais comumente observado foi tosse. Apenas 4% dos pacientes <sup>2/53</sup> submetidos à técnica com inalação prévia de broncodilatador apresentaram tosse. Já na técnica concomitante à broncoprovocação, a tosse foi observada em 13% <sup>23/182</sup> dos pacientes ( $p = 0,0005$ ).

Ao analisar o escarro coletado, não houve diferença entre os dois grupos na contagem total de células, na percentagem de neutrófilos e de linfócitos, na dosagem de proteína catiônica eosinofílica e nem de interleucina (IL)-8. Houve diferença significativa na viabilidade celular, na percentagem de macrófagos, de eosinófilos e de células epiteliais e no tempo de nebulização. O tempo de nebulização foi superior na técnica associada à broncoprovocação.<sup>11</sup>

A variação no tempo de nebulização pode alterar a contagem diferencial de células (percentagem de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e macrófagos).<sup>13</sup> Nebulizações realizadas por períodos mais longos fornecem amostras de escarro de vias aéreas mais inferiores, resultando em menos neutrófilos e eosinófilos e mais macrófagos. Nebulizações por períodos mais curtos viabilizam escarro de vias aéreas mais proximais, sendo o diferencial de células mais rico em neutrófilos e eosinófilos, com menos

macrófagos alveolares.<sup>5,15</sup> Isto pode explicar a diferença na contagem de células encontrada no estudo de Jones e colaboradores: nos pacientes submetidos à técnica com inalação prévia de broncodilatador observou-se menor tempo de nebulização, maior percentagem de eosinófilos e menor percentagem de macrófagos.<sup>11</sup>

Para assegurar coleta de material de vias aéreas mais inferiores e evitar diferenças entre as amostras coletadas, recomenda-se o uso de tempos constantes e mais prolongados de nebulizações durante a indução de escarro. Atualmente sugere-se um tempo de nebulização de pelo menos 15 minutos, podendo as nebulizações serem realizadas por mais 5 minutos se uma amostra adequada de escarro não tiver sido obtida.<sup>5,13</sup> O período total de nebulizações deve ser sempre citado, a fim de possibilitar adequada comparação entre os resultados dos diferentes estudos publicados.<sup>13</sup>

#### Efeitos colaterais da indução de escarro:

Mesmo sendo considerado método seguro e bem tolerado pelos pacientes, a indução de escarro com solução salina hipertônica pode apresentar alguns efeitos colaterais.

Entre os eventos mais comuns estão a salivação, boca salgada e náuseas, podendo estas serem evitadas ou amenizadas se o paciente lavar a boca com água antes do início e entre o intervalo de cada nebulização. Os sintomas respiratórios: tosse, dispnéia e broncoconstricção, podem ser prevenidos com inalação de broncodilatador antes do início do exame.<sup>13</sup>

---

Nos pacientes que apresentarem função pulmonar reduzida antes do início da indução de escarro, a mesma pode ser realizada com solução salina isotônica e inalação prévia de 200 a 400 mcg de salbutamol spray, diminuindo-se assim a chance de piora da função pulmonar.<sup>5,14</sup>

#### Qualidade da amostra de escarro:

Independente de qual método for escolhido, o objetivo principal é obter uma amostra adequada de escarro. O escarro é composto por líquidos e componentes celulares como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, células da mucosa brônquica e células inflamatórias. Quando expectorado, há mistura do escarro com saliva, células epiteliais escamosas e bactérias da orofaringe.<sup>16</sup> A contaminação por saliva, rica em células escamosas, é um problema comum. As células escamosas são células grandes que, em concentrações elevadas, dificultam a visualização de outras células.<sup>5,16</sup>

A contaminação da amostra por saliva e por secreções da via aérea superior pode ser minimizada se o paciente lavar a boca com água antes de iniciar o exame e durante o intervalo das nebulizações e se assoar o nariz antes do início da indução.<sup>5,16</sup>

Após processada, a amostra é considerada adequada se houver: pouca contaminação por saliva (< 20% de células escamosas);<sup>4,10,16,17</sup> viabilidade celular superior a 50%, visualizada em hemocítômetro, sendo as lâminas coradas com azul de Tripán;<sup>4,16,17</sup> escore de qualidade celular superior a 4: são avaliadas a quantidade de debris celulares, as bordas celulares e a impressão geral do observador (escore com

---

pontuação mínima de 3 e máxima de 9); e <sup>16</sup> possibilidade de analisar pelo menos 400 células.<sup>4,13,16</sup>

#### Processamento e análise do escarro induzido:

Um adequado processamento e análise da amostra devem ser realizados. Isto requer uma equipe de profissionais responsáveis, experientes e com treinamento adequado, utilizando técnicas pré-validadas.<sup>13,18</sup> Há duas técnicas validadas bastante utilizadas atualmente: uma seleciona (com o auxílio de um microscópio) os “plugs” de secreção da amostra, tentando assim diminuir a quantidade de saliva. O material selecionado é então processado. A outra técnica processa todo o material coletado, sem separação da saliva. A vantagem de selecionar o escarro antes do processamento da amostra é a possibilidade de diminuir a contaminação da amostra por saliva, sendo conseqüentemente menor a percentagem de células escamosas nas lâminas processadas, facilitando a visualização das outras células. A desvantagem deste método é a necessidade de um microscópio invertido (nem sempre disponível nos laboratórios) e um tempo maior de processamento da amostra.<sup>5,18</sup>

O material pode ser processado em até 9 h após a coleta se armazenado a -4 graus C,<sup>17</sup> mas recomenda-se o processamento da amostra em até 2 horas.<sup>4,17,19</sup>

Após processada, a amostra pode ser analisada quanto a características celulares (contagem total de células, percentagem de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos e células escamosas) e bioquímicas.<sup>18,19</sup>

---

Independente de qual componente do escarro induzido for analisado, esta análise deve ser sempre validada. Até o momento, a análise do escarro induzido foi validada principalmente quanto à concentração de eosinófilos, expressa em porcentagem de eosinófilos sobre a quantidade total de células não escamosas observadas na amostra.<sup>19</sup>

#### Utilidade do EI na prática clínica:

A identificação do padrão inflamatório da mucosa brônquica tem ajudado no diagnóstico e no melhor entendimento da asma e também na decisão de condutas terapêuticas. Já se sabe que na “asma clássica” (associada à alergia) há aumento da concentração de eosinófilos na mucosa brônquica<sup>20</sup> e que a terapia com corticoesteróides pode ajudar a diminuir essa concentração.<sup>21</sup> A monitoração da concentração de eosinófilos no EI pode ser útil para prever resposta ao tratamento com corticóides e também para auxiliar na suspensão do mesmo.<sup>22</sup> Pacientes com concentrações de eosinófilos inferiores a 3% apresentam pobre resposta à corticoterapia.<sup>23</sup> Alterações nas concentrações de eosinófilos no EI podem também ajudar no diagnóstico de pacientes com asma ocupacional.<sup>24</sup> Foi descrito ainda que pacientes em exacerbação de asma ou com asma grave apresentam um aumento da concentração de neutrófilos,<sup>17,25</sup> e que pacientes com tosse crônica não relacionada à asma e sem inflamação eosinofílica não respondem ao tratamento inalatório com budesonida.<sup>26</sup>

Outra colaboração da avaliação da resposta inflamatória brônquica é a identificação de novos fenótipos de asma sem associação com atopia, onde a inflamação eosinofílica nem sempre está presente. Em revisão realizada por Dowes e colaboradores,

---

apenas 50% dos casos de asma apresentaram uma inflamação predominantemente eosinofílica. Nos demais casos uma inflamação neutrofílica se mostrou presente, tanto em pacientes com asma grave como naqueles que apresentavam asma leve e moderada.<sup>27</sup>

#### Uso do EI no estudo da asma:

O EI surgiu como um método não-invasivo para a coleta de material da mucosa brônquica, facilitando o estudo das características inflamatórias locais de via aérea. O grande número de estudos realizados na última década demonstra a importância do EI no estudo da asma. É consenso na literatura de que a asma é uma doença multifatorial, sendo sua fisiopatogenia influenciada por fatores genéticos, socio-econômicos e ambientais.<sup>1,28,29,30</sup> A influência dos fatores ambientais e a identificação de fatores de risco para a doença têm sido amplamente estudados em grandes estudos epidemiológicos.<sup>1</sup> A avaliação de características inflamatórias por meio do EI pode ser incluída em estudos epidemiológicos e quem sabe relações entre padrões inflamatórios e fatores de risco para asma possam ser encontrados. Outra vantagem do EI é a viabilidade de seu uso em crianças. O uso do EI contribuiu de forma significativa no estudo da inflamação de via aérea neste grupo de pacientes, onde a realização de broncoscopia com LBA muitas vezes não era possível por implicações éticas. Gibson publicou em 1998 estudo descrevendo o uso do EI em crianças com asma. O método é seguro e com taxas de sucesso semelhantes aos adultos, sendo viável em crianças a partir de 6 anos de idade.<sup>9</sup>

Para adequada utilização do EI na pesquisa clínica, Inman e colaboradores sugerem que cada grupo de pesquisa determine o tamanho de amostra baseado em dados de variabilidade e reprodutibilidade da concentração de eosinófilos no escarro de sua própria população.<sup>7</sup> Portanto, deve-se inicialmente realizar estudos que descrevam as características citológicas do escarro induzido da população que se pretenda estudar. No Brasil, recentemente foi publicado um estudo realizado em São Paulo, o qual descreveu as características citológicas em pacientes de 6 a 18 anos, estáveis ou em exacerbação de asma. O exame se mostrou seguro (inclusive no pacientes em exacerbação de asma), com taxa de sucesso de 67%. Os achados citológicos foram comparados entre quatro grupos (asma leve, moderada, grave e exacerbação de asma), não sendo encontrada diferença na quantificação de eosinófilos. Isto pode ser atribuído ao fato de neste estudo todos os pacientes estarem recebendo terapia com corticoesteróides, o que diminui a concentração de eosinófilos na mucosa brônquica. Nos pacientes em exacerbação de asma houve predomínio de neutrófilos ( $p < 0,005$ ).<sup>17</sup>

No Rio Grande do Sul ainda não há dados descritos referentes à percentagem de eosinófilos no escarro induzido de pacientes com ou sem asma.

Como já discutido anteriormente, o uso do EI pode levar a um melhor entendimento da fisiopatogenia da asma. Entretanto, os estudos utilizando este método devem ser realizados apenas por equipes previamente treinadas e com experiência, assegurando-se assim resultados confiáveis.<sup>13</sup>

---

**CONCLUSÃO**

O EI viabiliza a análise das características inflamatórias da via aérea inferior de forma não invasiva, sendo utilizado amplamente desde a última década. Mostrou-se um método seguro, acurado e viável, mesmo na população pediátrica. O sucesso do exame depende do treinamento adequado de toda a equipe, desde a indução do escarro até o processamento e análise da amostra. A descrição da percentagem de eosinófilos e neutrófilos na mucosa brônquica possibilitou a identificação de fenótipos de asma não-eosinofílica, não associados à alergia. A monitorização da concentração de eosinófilos na mucosa brônquica por meio do EI pode ajudar a prever resposta ao tratamento com corticoesteróides e também auxiliar no processo de redução e suspensão do mesmo. Estudos que associem dados epidemiológicos da asma com as manifestações inflamatórias da mucosa brônquica podem sucumbir num melhor entendimento da doença e talvez na identificação de novas opções terapêuticas, específicas para cada tipo de paciente.

---

**REFERÊNCIAS**

1. Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J.* 1998;12:315-35.
  2. Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. *Paediatric Respiratory Reviews.* 2004;5:155-161.
  3. Global Initiative of Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda(MD): National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health;2002. NIH publication 02-3659. Available at: <http://www.ginasthma.com>
  4. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax.* 1992; 47: 25-29.
  5. Djukanovic R. Induced Sputum. Chestnet, PCCU, lesson 4, vol 16. [www.chestnet.org/education/online/pccu/vol16/lessons3-4/lesson04.php](http://www.chestnet.org/education/online/pccu/vol16/lessons3-4/lesson04.php)
  6. Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, et al. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax.* 2000 Sep;55(9):768-74.
  7. Inman MD, Jayaram L, Bel EH, et al. The use of induced sputum in clinical trials. *Eur Respir J.* 2002;20:47s-50s.
  8. Wong HH, Fahy JV. Safety of one method of sputum induction in asthmatics subjects. *Respir Crit Care Med.* 1997;156:299-303.
  9. Gibson PG. Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102:S100-01
-

10. Popov TA, Pizzichini MMM, Pizzichini E, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J.* 1995;8;559-65.
  11. Jones PD, Hankin R, Simpson J, et al. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001.;164(7):1146-49.
  12. Pizzichini MMM, Popov TA, Efthimiadis A, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *AM J Respir Crit Care Med.* 1996;154:866-9.
  13. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, et al. Sputum induction. *Eur Respir J.* 2002;20:3S-8S.
  14. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland L, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma. Kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:1501-6.
  15. Gershman NH, Liu H, Wong HH, et al. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different points. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:322-8.
  16. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, et al. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J.* 1996;9:1174-80.
  17. Palomino ALM, Bussambra MHCF, Saraiva-Romanholo BM, et al. Escarro induzido em crianças e adolescentes com asma: segurança, aplicabilidade clínica e perfil de células inflamatórias em pacientes estáveis e durante exacerbção. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81(3):216-24.
  18. Efthimiadis A, Spanevello A, Hammid Q, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur Respir J.* 2002;20(Suppl.37):S19-S23.
-

19. Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. *Eur Respir J*. 2000;16:355-9.
  20. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax*. 2003 Feb;58(2):116-21.
  21. Gibson PG, Saltos N, Fakes K. Acute anti-inflammatory effects of inhaled budesonid in asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jan;163(1):32-6.
  22. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, et al. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 May;171(10):1077-82.
  23. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, et al. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*. 1999;353(9171):2213-14.
  24. Lemiere C, Pizzichini MM, Balkisson R, et al. Diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Eur Respir J*. 1999 Mar;13(3):482-8.
  25. Fahy JV, Kim KW, Liu J, et al. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95:843-52.
  26. Pizzichini MM, Pizzichini E, Parameswaran K, et al. Nonasthmatic chronic cough: No effect of treatment with an inhaled corticosteroid in patients without sputum eosinophilia. *Can Respir J*. 1999 Jul-Aug;6(4):323-30.
  27. Douwes J, Gibson PG, Pekkanen J, et al. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*. 2002;57:643-48.
  28. Gibson PG, Henry RL, Shah S, Powell H, Wang H. Migration to a western country increases asthma symptoms but not eosinophilic airway inflammation. *Pediatr Pulmonol*. 2003 Sep;36(3):209-15.
-

29. Kurukulaaratchy RJ, Fenn M, Matthews S, Arshad SH. Characterisation of atopic and non-atopic wheeze in 10 year old children. *Thorax*. 2004;59:563-68.
  30. Céledon JC, Wright RJ, Litonjua AA, Sredl D, Ryan L, et al. Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1239-1243.
-

---

## **ANEXOS**

---

**Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Adendo, utilizado para o estudo atual)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Seu filho(a) já está participando do estudo coordenado pela Dra Marilyn Urrutia Pereira e está sendo convidado para participar de mais um estudo. Este novo estudo tem o título de “Características citológicas do escarro induzido em crianças sibilantes e em crianças normais”. Nosso objetivo é avaliar inflamação nos brônquios (canais de ar dentro dos pulmões) e para isso pretendemos coletar escarro (catarro) dos pulmões de seu filho(a).

Coleta do escarro: para coletar o escarro faremos nebulizações com soro salgado (mais ou menos como a água do mar) por um tempo de no máximo 20 minutos. Esta nebulização faz os pulmões soltarem catarro. O catarro coletado vai ser examinado para ver diferentes tipos de inflamação (parte desse exame vai ser feita no dia da coleta e outra parte do catarro vai ser guardada para no futuro examinar novamente outros tipos de inflamação).

Efeitos colaterais: durante as nebulizações seu filho(a) pode ter boca seca, aumento da produção de saliva (guspe) e enjôo. Esses sintomas podem ser evitados lavando a boca com água. Pode também acontecer tosse, leve dificuldade para respirar (falta de ar) e chiado no peito, mas geralmente esses efeitos são passageiros. Eles podem ser evitados se antes do exame o seu filho(a) receber salbutamol spray (remédio parecido com o Berotec, que serve para abrir os brônquios): este remédio será dado ao seu filho(a) antes de começar o exame. Se seu filho(a) sentir falta de ar ou chiado, novamente vai receber o salbutamol spray e o exame será interrompido (terminado). O exame só vai ser novamente começado se seu filho(a) estiver se sentindo bem.

Todos os dados deste estudo são confidenciais e se seu filho(a) desistir de participar, isto pode ser feito a qualquer momento, sem que haja qualquer forma de prejuízo. Os pesquisadores garantem o direito a perguntas ou esclarecimentos específicos sobre os procedimentos realizados ou sobre os resultados obtidos.

---

As informações obtidas neste estudo são muito importantes para ajudar a entender mais sobre doenças alérgicas em Uruguaiana e podem ajudar a explicar como acontece a inflamação na asma. Por isso a participação de seu filho(a) é muito valiosa.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre todos os procedimentos que serão feitos e os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas, e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo são confidenciais e privadas, e que poderei retirar meu filho(a) do estudo a qualquer momento.

Caso necessite, poderei chamar a coordenadora da pesquisa em Uruguaiana, Dra. Marilyn Urrutia Pereira pelo telefone 55-4114822, ou Dra Anna Cláudia Drews pelo telefone 51-9245-0893 ou 51-3384-5104 (pesquisadora responsável pelo estudo atual).

Declaro que recebi cópia deste termo de consentimento, ficando outra cópia sob os cuidados do pesquisador responsável.

\_\_\_\_\_  
Nome da criança

\_\_\_\_\_  
Assinatura da criança, se aplicável

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome do entrevistador (autorizado a aplicar o termo de consentimento)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do entrevistador

\_\_\_\_\_  
Data

**Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Dissertação Dr Marilyn Urrutia Pereira**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

As doenças alérgicas, como asma, rinite e dermatite atópica (alergia de pele) são mais comuns hoje em dia do que eram antigamente. Sabemos muito pouco do porque do aumento dessas doenças que são muito incômodas, principalmente para as crianças. Nesta pesquisa queremos saber quantas crianças entre 9 e 12 anos, na cidade de Uruguaiana e arredores, apresentam asma, rinite (alergia de nariz) ou dermatite atópica (alergia de pele). Queremos também saber informações sobre a família, a criança e seu meio ambiente para podermos ter idéia de quais são os fatores de risco associados a estas doenças.

Se você concordar que seu(sua) filho(a) participe desta pesquisa, marque as avaliações que ele(a) poderá realizar:

- ( ) A mãe ou responsável legal deverá responder a um questionário sobre a criança, sua família e seu meio ambiente, realizado por um entrevistador;
  - ( ) Exame físico da criança, para investigar dermatite atópica (alergia de pele) na criança;
  - ( ) Coleta de fezes, para avaliar verminoses;
  - ( ) Teste cutâneo, para ver se a criança é alérgica. O teste consiste em uma pequenas picadas no antebraço para ver se a criança tem alergia às substâncias colocadas em gotinhas sobre a pele. Caso a criança seja alérgica a alguma das substâncias (ácaros do pó, pelo de gato, pelo de cachorro, grama, fungos) uma pequena reação na pele acontece. Os possíveis desconfortos causados pelo exame são: vermelhidão e coceira no local da aplicação do teste cutâneo. Para evitar maior desconforto, será fornecido, se necessário, imediatamente após o exame, medicamento (pomada) que diminua a irritação;
  - ( ) Coleta de sangue para estudo de alergias, e de sangue para avaliação genética (para ver características familiares das doenças). Serão coletados 5ml de sangue, através de punção com agulha;
-

( ) Teste de capacidade pulmonar (espirometria). A criança deverá soprar através de um bocal para medir sua capacidade pulmonar. O primeiro teste será feito antes e após o uso de uma medicação bronco-dilatadora (salbutamol) muito segura e usada sem problemas por crianças, mesmo em suas casas. Os efeitos colaterais mais comuns são de taquicardia e tremor, mas quando presentes, não oferecem qualquer perigo. Uma segunda testagem será feita antes a após um período de corrida de alguns minutos.

Todos os dados da pesquisa são confidenciais, e o abandono da pesquisa, por parte do escolar, pode ser feito a qualquer momento, sem que haja qualquer forma de prejuízo. Os pesquisadores garantem o direito a perguntas ou esclarecimentos específicos sobre os procedimentos realizados, ou sobre os resultados obtidos.

As informações obtidas neste estudo são muito importantes para que se possa conhecer mais sobre doenças alérgicas em Uruguaiana e poder se estudar suas possíveis causas em outros centros de pesquisa, portanto a participação de seu filho(a) é muito valiosa.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre todos os procedimentos que serão feitos e os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas, e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo são confidenciais e privadas, e que poderei retirar meu filho(a) do estudo a qualquer momento.

Caso necessite, poderei chamar a coordenadora da pesquisa em Uruguaiana, Dra. Marilyn Urrutia Pereira pelo telefone 55-4114822.

Declaro que recebi cópia do presente consentimento, ficando outra cópia sob os cuidados do pesquisador responsável.

Nome do responsável: \_\_\_\_\_ Ass: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do entrevistador: \_\_\_\_\_ Ass.: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

## Anexo 3 - Questionário

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA / INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS**

**CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DO ESCARRO INDUZIDOS EM CRIANÇAS  
SIBILANTES E EM CRIANÇAS NORMAIS**

Nome do Aluno: \_\_\_\_\_  
REGISTRO: \_\_\_\_\_  
Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_      Sexo:    masc.      fem.  
Mãe/Resp.: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Bairro: \_\_\_\_\_      Telefone: \_\_\_\_\_  
Escola: \_\_\_\_\_      Série: \_\_\_\_\_<sup>a</sup>  
Em que dia o questionário foi preenchido? \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**1. PERGUNTAS SOBRE PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS:**

1.1 Alguma vez na vida seu filho/a teve chiado (tipo miado de gato ou apito) no peito?

Sim                      Não

SE A RESPOSTA ACIMA FOI "NÃO", POR FAVOR, PASSE À PERGUNTA 1.6.

1.2 Nos últimos 12 meses seu filho/a teve chiado (tipo miado de gato ou apito) no peito?

Sim                      Não

SE A RESPOSTA ACIMA FOI "NÃO", POR FAVOR, PASSE À PERGUNTA 1.6.

1.3 Nos últimos 12 meses quantas crises/ataques de chiado (tipo miado de gato ou apito) no peito seu filho/a teve?

Nenhuma              1 a 3      4 a 12              Mais de 12

1.4 Nos últimos 12 meses quantas vezes seu filho/a acordou à noite por causa de chiado (tipo miado de gato ou apito) ?

Nunca se acordou com chiado      Menos de 1 noite por semana

Uma ou mais de uma noite por semana

1.5 Nos últimos 12 meses os chiados (tipo miado de gato ou apito) no peito têm sido tão graves que seu filho não consiga dizer duas palavras seguidas sem que tenha que parar para respirar?

Sim                      Não

1.6 Seu filho/a teve asma alguma vez na vida?

Sim                      Não

1.7 Nos últimos 12 meses você notou chiado (tipo miado de gato ou apito) no peito de seu filho/a ao respirar, durante ou depois de fazer exercício (correr, jogar bola, pular, etc.)?

Sim                      Não

1.8 Nos últimos 12 meses seu filho/a tem apresentado tosse seca à noite, que não tenha sido a tosse por resfriado ou gripe?

Sim              Não

1.9 Nos últimos 12 meses você ouviu chiado (tipo miado de gato ou apito) no peito de seu filho durante ou após exercícios?

Sim                      Não

1.10 Nos últimos 12 meses quantas vezes seu filho/a internou no hospital por crise de chiado ou asma?

Nenhuma              Uma vez              Duas vezes              Mais de 2 vezes

1.11 Nos últimos 12 meses quantos dias de colégio (completos ou em parte) seu filho/a perdeu por chiado ou asma?

Nenhum              1 a 5 dias              6 a 10 dias              Mais de 10 dias

1.12 Nos últimos 30 dias seu filho/a teve gripe, resfriado ou outras doenças respiratórias?

Não                      Sim

---

**Anexo 4 - Ficha de dados do paciente**

- 1) Identificação (registro): \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_
- 2) Peso: \_\_\_\_\_ (kg) Altura: \_\_\_\_\_ (cm)
- 3) Medicamentos nos últimos 30 dias (corticóides, imunossupressores, etc):
- 4) Doenças nos últimos 30 dias (doenças respiratórias, etc):
- 5) Doenças crônicas além de asma:
- 6) Espirometria: VEF1 (basal): \_\_\_\_\_ L (\_\_\_\_%)  
Pós-salbutamol (pós-BD): \_\_\_\_\_ L (\_\_\_\_%)  
15% queda: \_\_\_\_\_ x 0,85 = \_\_\_\_\_%
- 7) Indução do escarro: \_\_\_\_:\_\_\_\_ h (início) \_\_\_\_:\_\_\_\_ h (término)
- |                                  |              |                 |
|----------------------------------|--------------|-----------------|
| Nebulizações: duração: _____ min | VEF1: _____% | CVF/VEF1: _____ |
| duração: _____ min               | VEF1: _____% | CVF/VEF1: _____ |
| duração: _____ min               | VEF1: _____% | CVF/VEF1: _____ |
| duração: _____ min               | VEF1: _____% | CVF/VEF1: _____ |
- Tempo total de nebulização: \_\_\_\_\_ min
- Tempo total de nebulização até conseguir primeira amostra de escarro: \_\_\_\_\_ min
- Critério de término do exame: ( ) desistência da criança  
( ) queda persistente VEF1  
( ) tempo total de 20 minutos
- 8) Amostra: volume total: \_\_\_\_\_ mL - armazenados 100 mL: ( )sim ( )não
- Cor: \_\_\_\_\_ (marron, verde, amarelo, etc)
- Número plugs de muco: \_\_\_\_\_ Células escamosas: \_\_\_\_\_%
- Volume processado: \_\_\_\_\_ mL Viabilidade: \_\_\_\_\_%
- Volume filtrado: \_\_\_\_\_ mL TCC: \_\_\_\_\_ x 10<sup>6</sup>/ML
- Sobrenadante: \_\_\_\_\_ mL – armazenado: ( )sim ( )não
- Processamento: \_\_\_\_:\_\_\_\_ h (início) \_\_\_\_:\_\_\_\_ h (término)
- 9) Citológico diferencial: 400 células contadas: ( )sim ( )não
- Eosinófilos: \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_%)
- Neutrófilos: \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_%)
- Macrófagos: \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_%)
- Linfócitos: \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_%)
- Cél. escamosas: \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_%)
-

---

## APÉNDICE

---

## Banco de dados: Parte I

ID	DN	COLETA	GENERO	IDADE	PESO	ALTURA	Cat antiga	Cat atual	Asma vida	Sib. vida	Sib ult ano	Atopia	VEF1 basal
25	12/5/1993	4/11/2006	1	12,3	60,00	153,00	1	1	1	1	1	1	90
87	30/10/1994	9/1/2006	1	11,9	58,00	160,00	1	1	1	1	1	1	95
99	15/3/1993	4/12/2006	2	13	45,00	160,00	1	1	1	1	1	1	98
107	5/2/1992	4/12/2006	2	13,9	37,00	148,00	1	1	1	1	1	1	102
109	19/10/1993	4/11/2006	2	12,5	44,00	152,00	2	2	1	1	1	2	93
187	9/10/1993	4/12/2006	1	12,6	54,00	158,00	3	3	2	2	2	2	105
216	10/7/1992	13/4/2006	1	13,5	49,00	154,00	2	2	1	1	1	2	88
238	5/8/1993	29/08/2006	2	13,2	55,00	150,00	3	3	2	2	2	2	93
267	1/10/1993	4/11/2006	1	13,2	55,00	155,00	3	3	2	2	2	2	97
282	24/02/1993	28/8/2006	2	13,5	60,00	158,00	2	2	1	1	1	2	94
316	14/02/1993	4/12/2006	2	13,1	39,00	145,00	3	3	2	2	2	2	100
410	19/06/1993	29/8/2006	2	13,1	52,00	146,00	1	1	1	1	1	1	99
425	4/6/1994	9/1/2006	1	12,4	46,00	146,00	1	1	1	1	1	1	99
436	6/11/1993	4/11/2006	1	12,8	44,00	154,00	2	2	2	1	1	2	93
438	22/09/1991	4/12/2006	1	14,6	47,00	165,00	3	3	2	2	2	2	92
439	1/4/1993	4/11/2006	1	13,2	59,00	160,00	2	2	2	1	1	2	99
487	6/4/1992	4/10/2006	1	13,8	60,00	157,00	2	2	2	1	1	2	89
495	27/07/1993	13/4/2006	2	12,8	43,00	153,00	3	3	2	1	2	2	90
500	27/06/1994	31/8/2006	1	12,1	50,00	151,00	1	1	1	1	1	1	83
522	26/07/1993	4/11/2006	2	12,8	42,00	151,00	1	1	2	1	1	1	84
534	17/06/1993	4/10/2006	2	12,9	30,00	145,00	3	3	2	2	2	2	96
535	5/9/1992	4/10/2006	2	13,9	65,00	156,00	1	1	1	1	1	1	90
579	21/9/1993	13/4/2006	2	12,5	44,00	147,00	2	2	2	1	1	2	86
582	7/5/1993	31/8/2006	1	13,1	57,00	154,00	1	1	2	1	1	1	100
625	28/9/1993	29/8/2006	1	12,9	36,00	144,00	2	2	2	1	1	2	104
630	16/11/1993	4/10/2006	2	12,5	50,00	145,00	2	2	2	1	1	2	94
633	21/01/1994	30/8/2006	2	12,5	35,00	138,00	2	2	2	1	1	2	98
647	1/11/1993	29/08/2006	2	13,5	45,00	157,00	2	2	2	2	1	2	94
722	29/06/1993	30/8/2006	2	13,1	45,00	152,00	2	2	2	1	1	2	99
724	20/07/1992	9/1/2006	2	14,1	50,00	158,00	1	1	1	1	1	1	96
772	13/10/1993	30/8/2006	1	12,9	55,00	160,00	1	1	1	1	1	1	94
841	28/12/1993	30/8/2006	2	12,7	55,00	157,00	1	1	2	1	1	1	94
853	30/06/1993	4/11/2006	2	12,9	36,00	147,00	3	3	2	2	2	2	100
892	3/10/1993	30/8/2006	2	13,4	50,00	150,00	1	1	1	1	1	1	101
900	11/4/1991	31/8/2006	2	14,7	46,00	150,00	1	1	2	1	1	1	90
944	20/4/1992	4/10/2006	1	14	53,00	153,00	1	1	2	1	1	1	92
949	7/12/1993	28/8/2006	1	13	55,00	156,00	1	1	1	1	1	1	94
950	3/9/1993	4/12/2006	1	13	33,00	137,00	2	2	1	1	1	2	98
1000	25/8/1993	9/1/2006	2	13	33,00	141,00	2	2	1	1	1	2	87
1131	6/2/1992	29/8/2006	1	14,1	33,00	138,00	2	2	2	1	1	2	93
1148	4/8/1994	30/8/2006	2	12,3	35,00	138,00	2	2	2	1	1	2	93
1168	19/06/1993	28/8/2006	1	13,1	50,00	152,00	2	2	1	1	1	2	97
1169	10/12/1993	28/8/2006	2	12,9	35,00	140,00	2	2	1	1	1	2	95
1200	25/01/1994	29/8/2006	2	12,7	44,00	150,00	2	2	2	1	1	2	99
1259	18/05/1992	4/11/2006	1	14	60,00	166,00	3	2	1	1	1	2	97
1273	12/5/1993	31/8/2006	2	12,7	38,00	141,00	3	3	2	1	2	2	90
1294	5/6/1992	29/8/2006	2	14,1	59,00	156,00	3	3	2	2	2	2	94
1408	2/11/1993	9/1/2006	2	13,6	62,00	156,00	1	1	1	1	1	1	90

Banco de dados: Parte II

VEF1/CVF	VEF1pós BD	VEF1 final indução	Amostra	Eosin	Neut	Mac	Linf	Escamos.	Viabilid.	TCC	Induc início	Induc fim	Tempo ind
0,78	91	89	2								8:50	9:30	40
0,8	96	97	1	12	11	72	3	16	87	7,2	15:20	15:50	30
0,86	98	96	1	10	10,5	76	1	20	88	1,2	10:21	11:00	39
0,87	100	97	1	64	0	34,5	1	6	82	13	10:35	11:10	35
0,79	97	95	1	1,2	10,7	83	2,1	13	86	3,4	9:15	9:40	35
0,88	102	102	1	0	12	82,6	2	8	75	1,8	14:15	14:50	45
0,81	92	93	1	1,2	11,6	84	0,4	14	90	4	16:05	16:35	30
0,89	94	91	1	0,5	12	86,3	0,2	15	93	3,6	15:15	15:44	29
0,8	96	97	1	0,1	20	76	1,6	11	90	3	16:20	16:55	35
0,84	97	96	2								14:30	15:16	46
0,86	100	98	1	1,1	19,4	77,7	0,8	6	66	1,9	15:55	16:25	30
0,82	97	100	2								17:00	17:31	31
0,77	102	104	1	3,3	10,4	83	1,1	12	88	5,8	15:14	15:53	39
0,79	92	95	3	0	0	0	0	100	97	1,5	15:30	16:05	35
0,88	96	95	1	0,5	20	76	1,5	18	88	2	14:22	15:05	38
0,88	95	94	1	0	17,8	79,4	1,1	19	71	2,3	14:27	15:00	33
0,78	92	91	1	0	18	78	1	9	75	2,4	9:27	9:55	28
0,85	90	88	3	0	0	0	0	100	73	1,8	16:20	16:50	30
0,79	87	86	1	0,2	12,1	86	0	20	68	3,4	14:18	14:49	31
0,78	90	89	3	0	0	1	0	99	60	0,3	15:47	16:23	36
0,85	95	92	3	0	0	0	0	100	60	1,2	14:56	15:35	39
0,84	92	89	1	13,5	11	73	0,3	11	90	9	15:00	15:40	40
0,79	90	88	1	0,3	21	73,1	1,6	20	95	3	10:32	11:04	32
0,87	97	96	2								16:13	16:39	26
0,88	102	102	1	3,5	20,9	74,5	0	17	93	3,5	17:00	17:33	33
0,86	95	93	1	0	30	65,7	1	6	80	2,4	17:00	17:28	28
0,85	96	97	2								15:30	16:05	35
0,84	95	93	1	0,6	25	71,2	0,2	16	90	4	16:00	16:35	35
0,8	98	97	1	66	7	24	2	0	83	5,8	18:00	18:28	28
0,81	99	97	3	0	0	34	1	60	90	3	17:16	17:44	28
0,8	93	90	1	56	10	29,2	4	0	80	2,9	16:30	17:00	30
0,79	94	93	1	1,3	19,3	79	0	20	90	5	14:45	15:20	35
0,88	99	99	1	0	21,3	76	0	20	66	2,6	14:20	14:53	33
0,85	100	95	1	8,2	11,8	77,8	0,2	15	89	4,5	9:05	9:40	35
0,83	92	88	1	1,6	15,4	79	2	20	95	1,4	9:10	9:37	27
0,84	94	95	1	6,3	11,3	77,7	1,1	5	64	5	15:10	15:40	30
0,79	96	95	1	10,2	10,7	76,4	0,7	2	89	3,2	13:30	14:00	30
0,87	97	97	1	0	15,9	78,5	4,2	6	80	1,7	10:20	10:46	26
0,78	86	87	1	6,2	18,6	73	0,7	17	83	7,6	15:58	16:29	31
0,8	96	95	1	0	17,9	75,6	5	9	60	5	14:20	14:55	35
0,78	95	92	1	4,1	20	70,7	2,1	3	62	4,1	15:35	16:06	31
0,87	97	97	2								13:25	13:50	25
0,83	96	96	3	0	0	3	1	96	85	2,2	15:25	16:00	35
0,86	102	101	1	0	15,2	81,9	0,4	7	90	1,9	13:10	13:37	27
0,84	98	95	1	1,3	31	65	1	20	49	1,5	15:32	16:00	28
0,82	95	89	1	1	27,5	71	0,5	16	78	3,2	9:54	10:25	31
0,86	96	95	3	0	0	0	0	100	100	0,8	9:25	10:10	45
0,77	95	94	1	8,4	11,3	79	0,3	6	79	2,9	16:35	17:00	25

## Banco de dados: Parte III

Tempo neb	Tempo prim amostra	Tempo coleta/proc	Tempo proces.	V. processado	V. filtrado	Precipitado	M. Conc
20							2
20	5	22	63	400	1500	1400	2
20	15	30	70	120	700	600	2
20	20	30	50	100	500	460	2
20	20	35	45	440	2050	1900	2
20	5	45	40	75	800	615	2
20	20	25	43	285	1900	1700	2
20	15	16	80	300	1530	1590	2
20	5	25	55	100	1800	1600	2
20							2
20	10	20	70	50	400	400	2
20							2
20	5	17	78	300	1000	900	2
20	20	40	40	30	100	100	2
20	15	35	65	300	1800	1600	2
20	10	20	40	100	800	800	2
20	10	30	65	250	2000	1660	2
20	10	10	50	50	400	300	2
20	5	31	80	300	1000	1100	2
20	15	22	80	100	800	470	2
20	5	25	63	100	800	620	2
20	10	20	90	200	1850	1800	2
20	5	16	50	100	700	700	2
20							2
20	15	30	72	280	1700	1500	2
20	10	22	60	300	2100	2000	2
20							2
20	15	36	86	400	900	800	2
20	20	30	82	500	1600	1500	2
20	15	35	74	600	1400	1400	2
20	20	30	85	700	1800	1600	2
20	20	20	77	100	400	300	2
20	10	27	75	100	800	600	2
20	20	20	72	300	1500	1300	2
20	15	23	88	250	900	850	2
20	5	20	70	50	400	400	2
20	20	15	75	200	1000	1000	2
20	5	14	60	300	2000	2000	2
20	10	11	89	400	1400	1200	2
20	5	10	55	400	2000	2000	2
20	10	25	84	400	1400	1300	2
20							2
20	15	15	55	100	600	550	2
20	20	21	77	600	1400	1400	2
20	20	35	85	500	3200	3000	2
20	20	33	69	500	1500	1400	2
20	20	20	85	50	100	80	2
20	10	22	68	400	1800	1700	2

## Banco de dados: Parte IV

ID	DN	COLETA	GENERO	IDADE	PESO	ALTURA	Cat antiga	Cat atual	Asma vida	Sib. vida	Sib ult ano	Atopia	VEF1 basal
1459	9/3/1994	30/8/2006	2	12	35,00	141,00	3	2	1	1	1	2	95
1494	27/06/1993	31/8/2006	1	13,1	48,00	160,00	1	1	2	1	1	1	85
1499	21/09/1993	9/1/2006	2	13	45,00	150,00	1	1	2	1	1	1	97
1576	29/05/1993	9/1/2006	1	13,2	45,00	156,00	1	1	1	1	1	1	98
1605	23/10/1994	9/1/2006	1	11,9	40,00	140,00	1	1	1	2	1	1	95
1624	16/10/1993	28/8/2006	1	12,9	45,00	150,00	1	1	1	1	1	1	88
1701	24/08/1994	9/1/2006	1	12,1	58,00	160,00	1	1	1	1	1	1	97
1717	15/05/1994	31/8/2006	1	12,1	40,00	143,00	2	2	2	1	1	2	96
1802	3/5/1994	9/1/2006	2	12,5	45,00	148,00	1	1	2	1	1	1	86
1818	26/02/1994	9/1/2006	2	12,6	47,00	156,00	1	1	1	1	1	1	89
1850	27/01/1993	9/1/2006	2	13,6	54,00	158,00	2	2	2	1	1	2	97
1855	3/5/1994	9/1/2006	2	12,5	44,00	157,00	1	1	2	1	1	1	84
1893	21/06/1992	4/12/2006	2	13,8	33,00	140,00	3	3	2	2	2	2	96
1903	25/06/1994	4/12/2006	2	11,9	33,00	139,00	3	3	2	2	2	2	99
1911	22/11/1993	31/8/2006	1	12,9	42,00	148,00	3	2	1	1	1	2	89
1914	8/9/1992	28/8/2006	1	14	40,00	145,00	2	2	1	1	1	2	95
1916	23/8/1994	29/08/2006	1	12	5,00	160,00	1	1	1	1	1	1	90
1925	25/02/1994	13/4/2006	2	12,1	47,00	156,00	3	2	1	1	1	2	88
1927	16/5/1994	13/4/2006	1	11,9	47,00	148,00	3	3	2	2	2	2	97
1940	28/10/1991	30/8/2006	2	14,9	47,00	157,00	3	2	1	1	1	2	85
1942	23/08/1992	31/8/2006	1	14	45,00	159,00	3	3	2	2	2	2	90
1946	16/01/1994	31/8/2006	1	12,5	33,00	133,00	3	2	1	1	1	2	93
1963	29/10/1993	28/8/2006	2	12,9	47,00	150,00	2	2	2	1	1	2	88
1976	13/01/1993	29/8/2006	2	13,5	42,00	140,00	3	3	2	2	2	2	99
1977	29/11/1993	31/8/2006	2	12,8	72,00	167,00	3	3	2	1	2	2	96
1996	20/03/1994	29/8/2006	2	12,4	60,00	162,00	3	3	2	2	2	2	98
2002	10/3/1994	29/8/2006	2	11,9	56,00	158,00	3	3	2	2	2	2	94
2003	6/6/1993	4/11/2006	1	12,9	59,00	152,00	3	3	2	2	2	2	95

## Banco de dados: Parte V

VEF1/CVF	VEF1pós BD	VEF1 final indução	Amostra	Eosin	Neut	Mac	Linf	Escamos.	Viabilid.	TCC	Induc início	Induc fim	Tempo ind
0,86	94	96	1	1,2	20,7	76,4	0,6	1	86	4,9	9:45	10:16	31
0,84	90	88	1	12,2	15	71,5	0,8	15	77	5,6	14:19	14:49	30
0,86	96	98	2								9:00	9:35	35
0,85	99	99	1	3,3	11	81,9	2,1	10	75	3,2	9:41	10:10	29
0,83	94	92	1	5,8	8	82	1,2	15	90	3	8:30	9:00	30
0,76	93	93	1	56	9,7	33	0,3	16	85	2,7	8:50	9:19	29
0,87	97	94	1	9	12	75,6	0,4	10	86	4,2	14:36	15:04	30
0,85	95	92	1	1	17,5	79	0,5	8	89	7,3	14:55	15:25	30
0,83	89	84	1	0,5	11	86	0	10	77	5,5	8:48	9:29	31
0,85	91	92	2								10:15	10:40	25
0,84	99	100	1	1	18,5	79	0,5	9	93	6,4	15:59	16:30	31
0,81	90	88	1	21,6	9	67	1,1	1	90	1,9	14:37	15:05	32
0,87	95	96	1	0	19	77	1	8	80	2,2	15:15	15:41	26
0,85	99	97	1	1,8	18	76,9	0,8	1	90	1,9	10:30	11:00	30
0,75	89	87	1	0	18,5	78,7	1	2	84	4	9:58	10:30	32
0,83	98	96	1	4,1	15	80	0	6	90	4,4	11:00	11:29	29
0,82	96	94	1	56,8	10	30,2	0	2	79	2,8	15:50	16:20	30
0,8	94	94	1	0	18	79,8	1	4	80	6	9:55	10:25	30
0,87	97	98	1	0,1	17	79,9	0,5	18	88	2	15:55	16:30	35
0,81	90	91	3	0	0	0	0	100	68	1,9	9:26	10:00	34
0,89	93	91	2								16:50	17:22	32
0,84	92	94	2								16:28	16:55	27
0,79	90	90	3	0	15,1	83,9	0	80	61	8	9:14	9:30	26
0,9	97	98	1	1	11	87	0	17	88	2,2	9:55	10:30	35
1,02	96	97	1	1	16	81	0,5	4	92	5,8	9:00	9:31	31
0,86	97	99	2								8:30	9:00	30
0,86	93	93	2								10:00	10:29	29
0,85	96	96	1	0	11,8	84	1,2	20	87	8	9:10	9:37	27

## Banco de dados: Parte VI

Tempo neb	Tempo prim amostra	Tempo coleta/proc	Tempo proces.	V. processado	V. filtrado	Precipitado	M. Conc
20	20	35	74	300	900	800	2
20	15	40	89	250	1000	900	2
20							2
20	10	30	75	500	1700	1500	2
20	20	10	70	600	2000	1700	2
20	20	15	91	700	1500	1400	2
20	15	31	70	150	200	100	2
20	10	38	84	250	1200	100	2
20	15	16	85	200	900	700	2
							2
20	5	30	85	100	300	200	2
20	10	25	90	300	1400	1300	2
20	15	39	40	200	500	460	2
20	10	15	50	300	1000	960	2
20	5	16	74	400	1800	1500	2
20	20	25	86	300	1400	1200	2
20	15	15	85	500	1900	1900	2
20	5	15	55	90	600	560	2
20	5	20	70	500	4000	2800	2
20	20	15	45	90	700	640	2
20							2
20							2
20	5	30	75	300	2500	2420	2
20	20	21	69	400	900	800	2
20	20	39	85	250	900	700	2
20							2
20							2
20	20	23	70	340	2500	2500	2

**LEGENDA DO BANCO DE DADOS**

**A – ID:** registro

**B – DN:** data de nascimento em dia/mês/ano

**C – COLETA:** data da indução/processamento do escarro, em dia/mês/ano

**D – GÊNERO:** Masculino: 1

Feminino: 2

**E – IDADE:** em anos

**F – PESO:** em kg

**G – ALTURA:** em cm

**H – CATEGORIA ANTIGA:** AA: 1

ANA: 2

NANA: 3

**I – CATEGORIA ATUAL:** AA: 1

ANA: 2

NANA: 3

**J – ASMA NA VIDA:** Sim: 1

Não: 2

**K – SIBILÂNCIA ALGUMA VEZ NA VIDA:** Sim: 1

Não: 2

**L – SIBILÂNCIA NOS ÚLTIMOS 12 MESES:** Sim: 1

Não: 2

**M – ATOPIA:** Sim: 1

Não: 2

**N – VEF1 basal:** em % do previsto, Polgar

**O – RELAÇÃO VEF1/CVF**

**P – VEF1 após uso de salbutamol:** em % previsto, Polgar

**Q – VEF1 AO FINAL DA INDUÇÃO:** em % previsto, Polgar

**R – AMOSTRA DE ESCARRO:** Sim : 1

Não conseguiu: 2

Inadequada (>20 células escamosas): 3

**S – PERCENTAGEM DE EOSINÓFILOS**

**T – PERCENTAGEM DE NEUTRÓFILOS**

**U – PERCENTAGEM DE MACRÓFAGOS**

**V – PERCENTAGEM DE LINFÓCITOS**

**W – PERCENTAGEM DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

**X – VIABILIDADE CELULAR:** em percentagem

**Y – TCC (CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS):** na unidade de  $\times 10^6/\text{ml}$

**Z – INÍCIO DA INDUÇÃO:** em hora e minutos

**AA – FINAL DA INDUÇÃO:** em hora e minutos

**AB – TEMPO TOTAL DA INDUÇÃO:** em minutos

**AC – TEMPO TOTAL DAS NEBULIZAÇÕES:** em minutos

**AD – TEMPO PARA OBTENÇÃO DA PRIMEIRA AMOSTRA DE ESCARRO:**  
em minutos

**AE – TEMPO ENTRE A COLETA DO ESCARRO E O INÍCIO DO  
PROCESSAMENTO:** em minutos

**AF – TEMPO TOTAL PARA TÉRMINO DO PROCESSAMENTO DA  
AMOSTRA:** em minutos

**AG – VOLUME DE ESCARRO PROCESSADO:** em mcl

**AH – VOLUME FILTRADO:** em mcl

**AI – VOLUME DO PRECIPITADO:** em mcl

**AJ – USO DE MEDICAMENTOS CONCOMITANTES:** Não: 2

---