

PUCRS

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

RODRIGO GODINHO DE SOUZA

**Características e variação do fenótipo inflamatório do escarro induzido em
crianças e adolescentes com asma grave resistente à terapia**

**Porto Alegre
2019.**

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



**Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

Rodrigo Godinho de Souza

**Características e variação do fenótipo inflamatório do escarro induzido em
crianças e adolescentes com asma grave resistente à terapia**

Porto Alegre, 2019

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

**Características e variação do fenótipo inflamatório do escarro induzido em
crianças e adolescentes com asma grave resistente à terapia**

RODRIGO GODINHO DE SOUZA

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

Orientador: Renato Stein
Co-orientador: Paulo Márcio Pitrez

Porto Alegre, 2019

Ficha Catalográfica

S729c Souza, Rodrigo Godinho de

Características e variação do fenótipo inflamatório do escarro induzido em crianças e adolescentes com asma grave resistente à terapia / Rodrigo Godinho de Souza . – 2019.

72.

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Pitrez.

1. Asma. 2. Asma resistente à terapia. 3. Asma infantil. 4. Função Pulmonar. I. Stein, Renato Tetelbom. II. Pitrez, Paulo Márcio. III. Título.

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

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

RODRIGO GODINHO DE SOUZA

Características e variação do fenótipo inflamatório do escarro induzido em crianças e adolescentes com asma grave resistente à terapia

Tese de Doutorado apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Saúde da Criança pelo Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 18 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto (PUC-RS)

Prof. Dr. Márcio Vinícius Fagundes Donadio (PUC-RS)

Prof^a. Dra. Nailê Karine Ñunez (UNIASSELVI-SC)

Prof. Dr. Renato Stein (Orientador)

Porto Alegre 2019.

Agradecimentos

O doutorado não é uma tarefa fácil, requer muita dedicação e tempo de trabalho, seria impossível concluí-lo sem a ajuda e colaboração de várias pessoas, que por sorte, cruzaram o meu caminho nestes anos em que me dediquei a pesquisa.

Primeiramente, gostaria de agradecer as pessoas mais importantes da minha vida, meus amores eternos, e que foram fundamentais para que fosse possível a conclusão deste trabalho. Minha esposa Vânia e meus filhos, Pedro e Bruna. Foram e são, a fonte de inspiração e motivação, nos momentos em que mais precisei e preciso. Obrigado pelo apoio e compreensão, amo vocês mais do que tudo. Aos meus pais pelo exemplo de seriedade e honestidade.

Ao meu orientador professor Dr. Paulo Pitrez, uma das pessoas mais motivadora, positiva e solícita que tive o prazer de trabalhar. Professor Paulo investiu muito em mim, me proporcionou oportunidades que jamais esquecerei. Fui técnico de seu laboratório por cinco anos, e nunca o vi como chefia, sempre o tratei por “professor”, que sempre foi a posição em que se colocava. Sempre ensinando com muita paciência e entusiasmo, escutando desde o aluno de iniciação científica, técnico do laboratório e alunos de mestrado e doutorado. Nas reuniões de grupo, todos tinham a sua atenção da mesma forma. Obrigado professor Paulo, tenho uma dívida de gratidão enorme para com o senhor, exemplo de profissional e liderança.

Agradeço ao professor Renato Stein, pela confiança depositada em mim quando me proporcionou a bolsa de doutorado e por me incluir como participante em algumas de suas pesquisas.

Agradeço a Dr^a Rita Mattiello, que conheço desde quando ela era pós doc, pela amizade, conselhos, preocupação, incentivo e principalmente por acreditar no meu trabalho e pelos incansáveis “tu mereces!”.

À todos os professores do PPG Pediatria que de alguma forma foram importantes para meu aprendizado, Ana Paula Duarte, Bárbara Porto, Leonardo Pinto, Marcus Jones, Renato Stein, Edgar Sarria e Márcio Donadio.

Aos professores Emílio Pizzichini e Márcia Pizzichini, por terem me recebido para estágio no NUPAIVA do Hospital universitário da UFSC, muito obrigado pela oportunidade.

Especialmente aos colegas, que se tornaram grandes amigos para a vida toda e que graças a PUC-RS tive o prazer de conhecer. Cristian Roncada por toda a sua presteza e agilidade em sanar minhas dúvidas, todos conselhos e principalmente os momentos de descontração; Aline Andrea por todo o ensinamento, conselhos, auxílio, e o mais importante de tudo, pelos momentos de descontração; Nailê Nuñez que tive o privilégio de conhecer na graduação e trabalhar com ela durante sete anos no IPB, é uma querida amiga e confidente,

aprendi muito com você; Mauro Vargas por todo o aprendizado, parceria e pelos momentos de descontração extra PUC, almoços e jantares em sua casa, saudades disso; Thiago Cardoso e Daniela Duarte, construímos uma grande amizade no NESC com vários almoços e mates descontraídos, além dos trabalhos que desenvolvemos juntos; Géssica Luana, sempre disposta a me ajudar na realização de alguns exames e em tudo o mais que precisei quando estava longe. Acompanhei seu crescimento profissional, desde a iniciação científica e tenho orgulho em dizer que pelo menos em uma pequena parcela, tenho um pouquinho de participação (bem pouquinho) na construção da excelente profissional que se tornou, acredite sempre em você Gé, eu acredito; Josiane Silva, da mesma forma me orgulha ter participado, nem que seja um pouquinho, da sua formação, uma das alunas mais comprometidas e dedicadas que tive o privilégio de conhecer, continue assim Josi; Tássia Taís, grande amiga e confidente que mesmo morando na Europa ainda mantemos contato.

À todos os colegas do IPB que tive o privilégio de trabalhar, que não foram poucos, Krist Helen, Keila Abreu, Vanessa Fey, Tiago Borges, Tiago Fazolo, Gabriela Souza, José Vargas, Moisés Dutra, Daniela Kaiber, Mariana Severo, Carolina Luft, Nathália Campos, João Paulo Heinzmann, Frederico Friedrich, Giovana Santos, Laíse Durante, Taila Piva, Renata Cambruzzi, André Zanluchi, Marcela Tornquist, muito obrigado pessoal, vocês foram fundamentais!

Às amigas Elisangela Baraldi e Carla Rothman, que sempre me auxiliaram com muita presteza e agilidade nas secretárias do IPB e do PPG Pediatria.

À todos os pacientes e responsáveis, que participaram do estudo, por sua disponibilidade e colaboração, sem vocês esse trabalho não seria possível.

À Capes pela bolsa integral, que me proporcionou dedicação exclusiva à pesquisa.

Resumo

Introdução: a asma é um problema de saúde global, com elevada prevalência, principalmente na população infantil. Das crianças com esta enfermidade, cerca de 5-10% não responde adequadamente ao tratamento medicamentoso, apresentando doença não controlada, mesmo com a melhor otimização do manejo clínico, sendo então classificados como asma grave resistente à terapia (AGRT). São escassos os estudos clínicos com pacientes pediátricos com AGRT. **Objetivo:** avaliar o perfil de inflamação das vias aéreas inferiores e as características da função pulmonar em crianças e adolescentes com AGRT, comparando com crianças com asma leve a moderada (ALM). **Métodos:** Foram selecionados pacientes com idade entre 6 e 18 anos, com o diagnóstico de AGRT (n=28), seguidos por mais de três meses em um centro de referência, independentemente do tratamento prescrito, e com ALM (n=75) de um estudo transversal em escolas públicas da mesma cidade. A classificação dos pacientes, AGRT ou ALM, seguiu critérios internacionalmente estabelecidos. Foram avaliados controle da doença, testes de função pulmonar e inflamação no escarro induzido. **Resultados:** pacientes com AGRT não apresentaram um padrão inflamatório diferente daqueles com ALM, mas o grupo AGRT mostrou uma frequência significativamente maior de exames de escarro sem inflamação (p=0,003). Foi encontrada uma correlação inversa entre as variáveis de VEF₁ (r= -0,83, p=0,0007), CVF (r= -0,75, p=0,004) e FEF₂₅₋₇₅ (r= -0,88, p=0,0001) e o número absoluto de neutrófilos, quando analisados pacientes (AGRT e ALM) com função pulmonar anormal. Por fim, observou-se mudança no padrão inflamatório dos pacientes com AGRT que realizaram dois exames de escarro em 9/16 (56%) dos casos. **Conclusão:** nossos achados mostram que pacientes pediátricos com AGRT não apresentam um padrão inflamatório diferente dos pacientes com asma mais leve, sugerem que a inflamação neutrofílica possa estar envolvida na piora da função pulmonar, e que a maior parte dos pacientes com asma grave modifica com o tempo o padrão de inflamação das vias aéreas inferiores.

Palavras-chave: Asma, asma resistente à terapia, asma infantil, função pulmonar, escarro induzido.

Abstract

Introduction: Asthma is a global health problem, with a high prevalence, especially in the child population. Of the children with this disease, about 5-10% do not respond adequately to the drug treatment, presenting no disease control, even with the best optimization of the clinical management, and then classified as severe therapy-resistant asthma (STRA). There are few clinical studies with pediatric patients with STRA.

Objective: to evaluate the lower airway inflammation profile and pulmonary function characteristics in children and adolescents with STRA, compared to children with mild to moderate asthma (MMA). **Methods:** Patients aged 6 to 18 years, with a diagnosis of STRA (n = 28), followed for more than three months in a reference center, regardless of the prescribed treatment, and with MMA (n = 75) were selected. a transversal study in public schools of the same city were selected. The classification of patients, STRA or MMA, followed internationally established criteria. Disease control, lung function tests, and inflammation in induced sputum were evaluated. **Results:** patients with STRA did not present an inflammatory pattern different from those with MMA, but the STRA group showed a significantly higher frequency of sputum exams without inflammation ($p = 0.003$). An inverse correlation was found between FEV1 ($r = -0.83$, $p = 0.0007$), FVC ($r = -0.75$, $p = 0.004$) and FEF25-75 ($r = -0.88$, $p = 0.0001$) and the absolute number of neutrophils when analyzed (STRA and MMA) with abnormal pulmonary function. Finally, there was a change in the inflammatory pattern of patients with STRA who underwent two sputum exams in 9/16 (56%) of the cases. **Conclusion:** Our findings show that pediatric patients with STRA do not present a different inflammatory pattern from patients with milder asthma, suggest that neutrophilic inflammation may be involved in worsening lung function, and that most patients with severe asthma modify the inflammation pattern of the lower airways.

Key words: Asthma, therapy-resistant asthma, childhood asthma, lung function, induced sputum.

Lista de figuras

Figura 1: Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo.....	27
Figura 2: Perfil inflamatório no primeiro exame de escarro.....	28
Figura 3: Controle da doença.....	28
Figura 4: Percentual dos tipos celulares na primeira amostra de escarro.....	29
Figura 5: Número absoluto de células na primeira amostra de escarro.....	30
Figura 6: Comparação entre o percentual de células inflamatórias.....	30
Figura 7: Percentual de células inflamatórias com e sem Omalizumabe.....	31
Figura 8: Comparação entre as variáveis de espirometria.....	32
Figura 9: Correlação entre a espirometria e neutrófilos.....	32
Figura 10: Perfil inflamatório no escarro induzido em pacientes com AGRT..	33

Lista de tabelas

Tabela 1: Caracterização da população.....	26
--	----

Lista de siglas e abreviaturas

ACT: *Asthma control test*

AGRT: Asma grave resistente à terapia

ALM: Asma leve a moderada

ATS: *American thoracic society*

C-ACT: *Children asthma control test*

CVF: Capacidade vital forçada

EI: Escarro induzido

ERS: *European respiratory society*

FEF₂₅₋₇₅: Fluxo expiratório forçado nos percentis 25% e 75% da capacidade vital

FeNO: Fração do óxido nítrico exalado

GINA: *Global initiative for asthma*

HSL: Hospital São Lucas

IgE: Imunoglobulina E

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-11: Interleucina 11

IL-13: Interleucina 13

IL-17: Interleucina 17

LABA: Beta agonista de longa ação

NOS2: Óxido nítrico sintetase

OMS: Organização mundial da saúde

TA: Termo de assentimento

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

Th: Células *T helper*

TH2: Células *T helper* do tipo 2

TNF β : fator de necrose tumoral β

UTI: Unidade de terapia intensiva

VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo

VEF₁/CVF: Razão de relação volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
	2.1 DEFINIÇÃO DE ASMA	15
	2.2 GRAVIDADE DA ASMA	16
	2.3 FENÓTIPOS	16
	2.4 ESCARRO INDUZIDO	17
	2.5 ESPIROMETRIA	18
	2.6 CONTROLE DA DOENÇA	18
3	HIPÓTESE	20
4	OBJETIVOS	20
	4.1 OBJETIVO GERAL	20
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5	MATERIAIS E MÉTODOS	20
	5.1 DELINEAMENTO	20
	5.2 LOCAL	21
	5.3 AMOSTRA	21
	5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	21
	5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	21
	5.6 VISITAS DO ESTUDO	22
	5.7 AVALIAÇÃO DE CONTROLE DA DOENÇA	22
	5.8 TESTE CUTÂNEO	22
	5.9 ESPIROMETRIA	23
	5.10 ESCARRO INDUZIDO	23
	5.11 ANÁLISE DO ESCARRO	24
	5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
6	ÉTICA	24
7	RESULTADOS	26
8	DISCUSSÃO	34
9	CONCLUSÃO	37
10	ANEXO I	38
	COMPROVANTE DE ACEITE PARA REVISÃO DO ARTIGO ORIGINAL	38
10	ANEXO II	39
	ARTIGO ORIGINAL	39
11	ANEXO III	56
	NÍVEL DE CONTROLE DOS SINTOMAS DE ASMA	56
12	ANEXO IV	57
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	57
11	ANEXO V	60
	TERMO DE ASSENTIMENTO	60
12	ANEXO VI	63
	PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	63
13	REFERÊNCIAS	68

1 Introdução

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, caracterizada por hiperresponsividade brônquica e limitação variável do fluxo aéreo, que resulta em episódios recorrentes de dispneia, tosse e sibilância.¹ Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 330 milhões de pessoas no mundo são portadoras da doença, com importante comprometimento da qualidade de vida, e índice de mortalidade mundial de 250.000 pessoas/ano.¹ É uma doença de elevada prevalência na população infantil em muitos países, sendo considerada uma das doenças de maior causa de hospitalizações no mundo. Falta de controle da doença, em muitos pacientes, e dificuldade de acesso ao tratamento, em alguns países, são importantes fatores para esses índices de morbimortalidade.^{1,2}

Em relação a gravidade da doença, sugere-se que seja classificada em leve, moderada e grave, baseado nos sintomas e quantidade de tratamento.¹ Considera-se asma leve, pacientes com o diagnóstico de asma que estejam com a doença controlada apenas com uso de baixas doses de corticoide inalado (etapas 1 e 2 do tratamento segundo critério da *Global Initiative for Asthma* - GINA). Para asma moderada, considera-se pacientes com diagnóstico de asma que estejam utilizando baixas doses de corticoide inalado em associação com broncodilatador de longa ação (etapa 3 do tratamento segundo a GINA). E finalmente, para a asma grave, os critérios são: diagnóstico de asma com prescrição de doses elevadas de corticoide inalado ($\geq 800 \mu\text{g}$ de budesonida ou similar), associado a mais um medicamento de controle e ou uso contínuo de corticoide sistêmico, antimuscarínico inalatório ou imunobiológicos (etapas 4 e 5 do tratamento da GINA). Mesmo com todo esse aporte medicamentoso, o paciente ainda apresenta, em muitas vezes, doença não controlada.¹

Estima-se que entre 5 e 10% dos asmáticos apresentam um quadro de asma grave.³ Embora crianças com asma grave sejam uma parcela reduzida de todos os asmáticos, estes são responsáveis por cerca de 50% dos custos com a doença.⁵ Esses pacientes necessitam de doses elevadas de medicamentos profiláticos, como corticoide inalatório, com resposta variável à terapia medicamentosa.⁶ O espectro da asma em crianças mais grave é a asma grave resistente à terapia (AGRT).⁷ Esta é caracterizada por crianças com asma grave que não respondem adequadamente ao tratamento e apresentam a doença não controlada, mesmo com a otimização do manejo clínico.^{3,8,9} Estes pacientes foram pouco estudados até o presente e são, além disso, a parcela de asmáticos com maior comprometimento da qualidade de vida e maior custo para a sociedade.^{5,10} Crianças com AGRT costumam apresentar sibilos recorrentes, tosse, dispneia, dificuldade para realizar esforço físico, sono

prejudicado pelos sintomas, importante limitação das atividades físicas, perda escolar, uso contínuo de medicações, visitas constantes em salas de emergência e hospitalizações, que são fatores determinantes para uma má condição de qualidade de vida.^{9, 11}

As características clínicas destes indivíduos foram pouco estudadas e variam entre as populações.^{12, 13} O diagnóstico de AGRT em criança é definido por ausência de controle da doença por mais de 3 meses, com necessidade de uso de altas doses de corticoide inalatório (maior ou igual a 800µg/dia de budesonida ou equivalente) em associação com broncodilatador de longa ação.⁹ Estudos relatam que há aumento de células inflamatórias em crianças com AGRT, no lavado bronco alveolar e biópsia brônquica,^{14, 15} porém estas são metodologias muito invasivas de coleta de amostras e conferem risco ao paciente.

A utilização do escarro induzido (EI) para avaliação da inflamação das vias aéreas, por ser uma técnica bastante abrangente e pouco invasiva, tem proporcionado um grande avanço na compreensão da fisiopatologia das doenças respiratórias, particularmente da asma.¹⁶ No entanto, a utilização desta ferramenta diagnóstica em crianças com AGRT ainda não é bem definida. Crianças com AGRT apresentam padrões inflamatórios de vias aéreas inferiores distintos, muitas vezes sem a presença de fenótipo inflamatório.^{17, 18} Além disso, este padrão parece variar com o decorrer do tempo. Com tudo, não existem estudos comparando o EI de crianças com ALM e AGRT, e as características de padrões inflamatórios, incluindo mudança de perfil ao longo do tempo, foram pouco estudadas, especialmente em crianças com AGRT.¹⁸ Em relação a mudança de perfil inflamatório ao longo do tempo, há apenas um estudo que mostrou haver mudança de perfil inflamatório em crianças em repetidos exames de escarro. Fleming e colaboradores demonstraram em seu trabalho, no qual avaliou 51 pacientes com AGRT e 28 com ALM ao longo de um ano, que em 63% dos casos houveram pelo menos duas mudanças no perfil inflamatório das crianças examinadas.¹⁸

Neste contexto, é necessário expandir o conhecimento em relação as características clínicas, funcionais e de inflamação das vias aéreas nesse grupo de crianças. O presente estudo tem como objetivo comparar o padrão inflamatório e os parâmetros de função pulmonar de crianças com ALM e AGRT, e verificar a manutenção ou instabilidade do padrão inflamatório ao longo do tempo, em uma amostra desta população de um país em desenvolvimento.

2 Revisão da literatura

2.1 Definição de asma

A asma é uma doença inflamatória crônica, das vias aéreas inferiores, caracterizada por hiperresponsividade brônquica, hipersecreção de muco e limitação variável do fluxo aéreo, o que pode levar a episódios recorrentes de tosse, dispneia e sibilância. A limitação do fluxo aéreo pode se resolver espontaneamente ou com o auxílio de broncodilatador de curta ação, na maioria dos casos. Em pacientes com doença mais grave, pode ser necessário o uso contínuo de corticoides inalados associado ao broncodilatador de longa ação, para manter o controle da doença.^{1, 2} Pacientes com a doença não controlada são mais suscetíveis a exacerbações, o que resultam em visitas frequentes às salas de emergência dos hospitais, em alguns casos com internações hospitalares e até óbito. É uma doença de elevada prevalência, morbidade, mortalidade e onerosa para a população. Estima-se que a prevalência de asma esteja entre 1% e 18% da população, variando entre os países, chegando a um total de mais de 330 milhões de indivíduos em todo o mundo, com um índice de mortalidade de 250.000 pessoas/ano.^{1, 2} No Brasil, a prevalência de asma em crianças em idade escolar, varia entre 15% a 24%, dependendo da faixa etária e da região.¹⁹

Atualmente é considerada uma doença complexa e heterogênea, podendo ser desencadeada por fatores genéticos, ambientais, emocionais, induzida por exercício e/ou infecções virais.

A asma possui apresentação atópica e não atópica, com base na presença ou ausência de imunoglobulina E (IgE) à alérgenos ambientais comuns. Tanto a asma atópica quanto a não atópica são caracterizadas por infiltração das vias aéreas por células *T-helper* (Th).²⁰ Na asma atópica, esses linfócitos Th secretam citocinas predominantemente do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) de caráter inflamatório, que são responsáveis pela síntese de IgE, recrutamento e ativação de eosinófilos, basófilos e mastócitos, e pela hiperplasia das células caliciformes, que ocasionará aumento na produção de muco e conseqüentemente a limitação do fluxo aéreo. A IL-4 é responsável, principalmente, pela retroalimentação positiva da resposta Th2 e produção de IgE. A IL-5 se encarrega principalmente pelo recrutamento, ativação e proliferação de eosinófilos. A IL-13 é responsável pela hiperplasia das células caliciformes, presentes no epitélio brônquico e que resultam em hipersecreção de muco, possuindo também influência sobre a musculatura lisa das vias aéreas, induzindo à hiperresponsividade brônquica.^{20, 21} Há também o aumento de TNF β , IL-11 e IL-17, que são fatores pró-fibróticos, responsáveis pelo aumento da produção e depósito de colágeno tipo I e tipo II na via aérea.²⁰

2.2 Gravidade da asma

A *Global Initiative for Asthma* (GINA) foi criada em 1993 por sociedades médicas e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Sua primeira publicação ocorreu em 1995 e foi amplamente adotada, servindo como base para diretrizes de diversos países,²² abordando a definição, diagnóstico e manejo da asma, e categorizando a doença, conforme características clínicas dos pacientes.²³ Porém, em 2006, a classificação da gravidade da asma passou a considerar o controle da doença (resposta ao tratamento), pois a gravidade da doença é lábil e muda conforme a resposta ao tratamento adotado. A versão de 2018 da GINA classifica a asma conforme o controle da doença, dividindo o tratamento em cinco etapas (Etapas 1, 2, 3, 4 e 5).¹ Assim, sugere-se que a asma seja classificada em três grupos: leve, moderada e grave. Abaixo é descrita a definição dos níveis de gravidade da asma:

- Asma leve: pacientes que necessitam de tratamento nas etapas 1 e 2 da GINA, no qual é possível controlar a doença com broncodilatador inalatório de curta ação com ou sem a utilização de corticoide inalatório em doses baixas (200-400 µg de budesonida ou similar).¹

- Asma moderada: pacientes que necessitam de tratamento na etapa 3 da GINA, no qual além do broncodilatador inalatório de curta ação, utiliza-se doses moderadas de corticosteroide inalado (400-800 µg budesonida ou similar).

- Asma grave: necessita das etapas 4 e 5 do tratamento sugerido pela GINA. São pacientes que necessitam de altas doses de corticoide inalatório (>800 µg de budesonida ou equivalente), em associação com broncodilatador inalatório de longa ação, antimuscarínico ou imunobiológicos. Em alguns casos, todo esse aporte medicamentoso não é suficiente para manter a doença do paciente controlada. Estima-se que cerca de 5 % a 10 % dos indivíduos asmáticos possuam asma grave.¹

2.3 Fenótipos

Por se tratar de uma doença heterogênea, possui uma gama de apresentações clínicas e fisiopatológicas, com diferentes respostas aos tratamentos. Tendo em vista essa heterogeneidade, surge-se o conceito de fenótipos da asma. Um fenótipo é definido por características observáveis de um indivíduo, que são o produto da interação entre fatores genéticos e os fatores ambientais. Esses fenótipos, quando identificados, podem ser úteis para a otimização do tratamento medicamentoso dos pacientes.⁹ Como exemplo de fenótipo de asma, podemos citar a asma eosinofílica, de modo que a inflamação das vias aéreas inferiores é resultado, predominantemente, do aumento da presença de eosinófilos.

2.4 Escarro induzido

As técnicas para identificação de um fenótipo podem ser invasivas ou não, tais como biópsia brônquica ou lavado broncoalveolar (invasivas), ou eosinofilia e IgE dosados em amostra de sangue periférico, escarro induzido ou fração exalada de óxido nítrico (FeNO) (não invasivas). Técnicas invasivas são raramente adotadas atualmente, devido aos riscos ao paciente. Entre as técnicas não invasivas mais utilizadas, destaca-se o escarro induzido. É considerada uma metodologia não invasiva e segura, com baixo risco ao paciente. Usualmente, pode ocorrer queda no VEF₁, o que é facilmente revertido com a administração de broncodilatador inalado de ação curta, podendo ocasionar broncoespasmo, porém raramente relatado, especialmente em crianças. É uma técnica validada e reprodutível, descrita por Pizzichini e colaboradores, no qual se obtém a amostra por meio de indução por inalação de solução salina hipertônica, podendo ser utilizada em concentração fixa ou crescente de acordo com a gravidade da doença. É considerado um método seguro, pois, a cada intervalo de inalação, totalizando 4 intervalos de 5 minutos de duração cada, o VEF₁ é verificado e comparado com o VEF₁ basal (antes da indução). Se houver queda maior ou igual a 15%, o teste é interrompido, para garantir a segurança do paciente e evitar maiores complicações.²⁴ Com o EI é possível saber qual o perfil inflamatório do paciente. Esse perfil é definido pelo percentual das células inflamatórias observado na amostra de escarro do paciente, em crianças, podendo ser classificado em: eosinofílico, quando o percentual de eosinófilo é maior ou igual a 2,5%; neutrofílico, quando o percentual de neutrófilos é maior ou igual a 54%; misto, quando o percentual de neutrófilos e eosinófilos estão acima do normal; ou pauci-granulocítico, quando o escarro não apresenta aumento de eosinófilos e neutrófilos.²⁵ O EI possibilita ainda a mensuração de marcadores como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, presentes na fase líquida do escarro.²⁴ Portanto, o escarro induzido pode ser uma importante ferramenta para avaliar a inflamação das vias aéreas inferiores, de forma não invasiva, e guiar a otimização do tratamento medicamentoso. No entanto, foi demonstrado que o perfil inflamatório de pacientes pediátricos com asma pode mudar com o passar do tempo, na maioria dos casos.¹⁸ Fleming e colaboradores, realizaram o único estudo em que é comparado mais de um exame de escarro induzido em um período curto de tempo (12 meses), em que foram avaliadas 51 pacientes com asma grave e 28 com asma leve. Constatou-se, neste estudo, que em 63% dos pacientes analisados, houve duas ou mais mudanças de perfil inflamatório no exame de escarro induzido, no período de um ano.¹⁸

2.5 Espirometria

A espirometria é um exame de fundamental importância em pneumologia, auxiliando no diagnóstico de obstrução pulmonar, na identificação de fatores de risco para doenças pulmonares, acompanhamento do crescimento pulmonar, identificação da diminuição da função pulmonar, entre outras.²⁶ É utilizada para verificação da limitação do fluxo aéreo.²⁷ Não é essencial no diagnóstico da asma, porém uma vez diagnosticada a doença, auxilia na detecção de risco aumentado de exacerbações futuras.²⁸ Trata-se de um exame que depende diretamente da compreensão e colaboração do paciente, porém uma vez que o paciente compreende o procedimento, é perfeitamente reproduzível.²⁹ A técnica de espirometria nos permite mensurar os volumes expiratórios, inspiratórios e os fluxos respiratórios.²⁸ Para essas medidas, são adotadas algumas nomenclaturas específicas. As mais comumente utilizadas, em pacientes pediátricos, são: capacidade vital forçada (CVF) corresponde ao volume de ar que se pode expirar, tão rápida e completamente, após inspiração profunda; volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) é uma medida obtida sobre a curva da CVF, que limita a medida no primeiro segundo da expiração; fluxo expiratório forçado nos percentís 25% e 75% ($FEF_{25\%-75\%}$) obtida também sobre a curva da CVF, registrando-se o fluxo expiratório médio na faixa de 25% a 75% da curva da CVF; razão entre o VEF_1/CVF mostra de forma mais sensível o padrão ventilatório do paciente (obstrutivo vs restritivo).²⁸

Para avaliação pulmonar do paciente com asma, é preciso se comparar as medidas espirométricas do indivíduo, com as médias das medidas da população hígida, com as mesmas características físicas, como peso, altura, sexo e idade. Por este motivo a importância dos valores espirométricos de referência. Existem inúmeras publicações com equações preditivas baseadas em uma amostra da população, mas geralmente são baseadas em amostras reduzidas, ou em uma população constituídas por apenas uma raça, ou ainda baseadas em dados espirométricos coletados há muitos anos. Nesse sentido, Quanjer e colaboradores desenvolveram uma equação de predição, baseada em uma amostra da população hígida, na qual foram avaliados mais de 31.000 homens e 42.000 mulheres.²⁶ Essa equação, por ser baseada em uma amostra considerável da população, é a que atualmente se utiliza para avaliação das características da função pulmonar de pacientes pediátricos.

2.6 Controle da doença

Por se tratar de uma doença crônica, o tratamento para asma busca atingir o pleno controle da doença.²⁹ Por definição, segundo a GINA, controle da doença é definido pelo manejo eficaz das características clínicas e sintomas da asma.¹ Entende-se por eficaz, a menor dose possível de medicação para obtenção do controle da doença, diminuindo ou

evitando efeitos adversos da medicação ao paciente.²⁹ Nesse sentido, foram desenvolvidos alguns instrumentos para avaliar o nível do controle da doença, que são baseados em uma série de perguntas direcionadas aos pacientes. As ferramentas mais comumente utilizadas para avaliar o controle da doença em pacientes pediátricos são: *Global Initiative for Asthma (GINA)*³⁰; *Asthma control test (ACT)*,²⁹ para crianças com 12 anos ou mais e *Children asthma control test (C-ACT)*,³¹ para crianças entre 6-12 anos, em que parte do questionário é direcionado aos pais ou cuidadores.

O questionário GINA é um questionário curto, de simples compreensão para o paciente, e rápido de aplicar, geralmente aplicado pelo pneumologista em cada consulta, em pacientes que estejam em acompanhamento ambulatorial. Possui apenas quatro perguntas que estão relacionadas as últimas quatro semanas do paciente, com respostas dicotômicas “Sim” ou “Não”, conforme a seguir:

- 1- Sintomas diurnos mais que duas vezes por semana?
- 2- Algum despertar noturno devido à asma?
- 3- Uso de medicação de resgate mais de duas vezes por semana?
- 4- Alguma limitação de atividade física pela asma?

Quando todas as respostas do paciente forem “Não”, então considera-se asma do paciente controlada, porém no caso de alguma das respostas ter sido “Sim”, considera-se a asma não controlada.³⁰

O controle da doença, só é efetivo se o tratamento medicamentoso estiver otimizado, de acordo com as orientações das diretrizes internacionais, e se o paciente apresentar uma efetiva adesão ao tratamento.¹ Sem o comprometimento do paciente, e dos pais ou cuidadores, para com o tratamento, dificilmente o controle da doença será alcançado.

3 Hipótese

O perfil inflamatório das vias aéreas inferiores das crianças e adolescentes com AGRT é diferente do perfil inflamatório de crianças e adolescentes com ALM, variando o perfil ao longo do tempo.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Comparar o perfil de inflamação das vias aéreas inferiores e as características da função pulmonar, em crianças e adolescentes com AGRT, comparando com crianças e adolescentes com ALM.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar os seguintes aspectos em crianças e adolescentes com AGRT, comparando com crianças e adolescentes com ALM:

- Inflamação das vias aéreas inferiores, por meio de exame de escarro induzido;
- Fluxos expiratórios e volumes expiratório através da espirometria;
- Correlação entre as variáveis do teste de espirometria e as variáveis de inflamação das vias aéreas inferiores;
- Comparação de dois momentos de exame de escarro de um mesmo paciente do grupo AGRT;
- Comparar o percentual de pacientes atópicos entre os grupos.

5 Materiais e métodos

5.1 Delineamento

O presente estudo caracteriza-se por um estudo de caso controle, com uma coorte aninhada para repetição de escarro induzido.

5.2 Local

Ambulatório de Asma Pediátrica do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS.

5.3 Amostra

A seleção das crianças e adolescentes com AGRT foi realizada por conveniência, baseada no cadastro de pacientes do centro de referência do estudo, de acordo com os critérios da diretriz internacional da ATS/ERS.⁹ As crianças com ALM foram selecionadas no mesmo ambulatório e em um banco de dados de outro estudo realizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, de acordo com a classificação da GINA.^{1,2}

5.4 Critérios de inclusão

Crianças e adolescentes com idades entre 6 e 18 anos, de ambos os sexos, com o diagnóstico de AGRT seguidos por mais de três meses no Ambulatório, independentemente do tratamento prescrito e pacientes com diagnóstico de ALM acompanhados no ambulatório e incluídos em estudo anterior. Os pacientes foram classificados em AGRT⁸ ou ALM de acordo com os critérios estabelecidos na literatura.^{1,2} Os critérios para o diagnóstico destes pacientes foram:

- Grupo AGRT: asma que necessita de tratamento nas etapas 4-5 do GINA¹ (≥ 800 mg/dia de budesonida ou equivalente, associado a LABA; uso de corticoide oral contínuo; ou Omalizumabe), apresentando doença não controlada. A doença não controlada é caracterizada por: 1) sintomas persistentes ou ACT <20 (>3 meses); 2) exacerbações agudas (com internação na UTI, pelo menos 2 internações, ou dois cursos de corticoide oral ao longo dos últimos 12 meses); ou 3) obstrução não reversível da função pulmonar, mesmo após a utilização de tratamento com corticoide.

- Grupo controle (ALM): crianças com asma que não preenchem os critérios para a asma grave. Os critérios para o diagnóstico de asma neste grupo foi: sintomas recorrentes de falta de ar, tosse, chiado, aperto no peito ou anormalidades na função pulmonar (VEF₁ e relação VEF₁/CVF reduzidos ou VEF₁ maior que 12% do valor basal após o uso de bronco dilatador). Além disso, os pacientes deste grupo deveriam estar com a doença controlada nos últimos 3 meses, usando tratamentos das etapas 1 a 3 da GINA.¹

5.5 Critérios de exclusão

Pacientes com limitações cognitivas/motoras ou outras doenças crônicas (doenças neurológicas, anomalias cardíacas, congênitas ou imunodeficiências), que poderiam comprometer a avaliação da asma, foram excluídos.

5.6 *Visitas do estudo*

Primeiramente, os pais ou responsáveis legais foram convidados a participar do presente estudo e autorizaram a participação de seu filho(a) através do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), com assinatura de termo de assentimento (TA) pela criança ou adolescente. Todos os participantes receberam explicação sobre o protocolo de visitas e procedimentos realizados durante o estudo pela equipe responsável. Abaixo, segue o protocolo das visitas propostas.

- Visita 0 (inclusão no estudo): TCLE, TA, avaliação do controle da doença (GINA) e testes de função pulmonar (espirometria).
- Visita 1: realização dos testes de escarro induzido, avaliação do controle da doença (GINA), testes de função pulmonar (espirometria) e teste cutâneo.
- Visita 2 (pelo menos 6 meses após visita 1): Apenas em pacientes com AGRT, avaliação do controle da doença (GINA), exame de escarro induzido e testes de função pulmonar (espirometria).

5.7 *Avaliação de controle da doença*

Para fins de controle da doença, os pacientes asmáticos foram convidados a responder um questionário curto, padronizado e bem estabelecido pela literatura, a cada visita do estudo. Foi utilizado o questionário para avaliação do controle da doença da GINA.¹

5.8 *Teste cutâneo*

O teste cutâneo (*Prick test*) foi adotado para avaliação de sensibilização a alérgenos, foi realizado na visita 0, através de método padronizado internacionalmente, reconhecido e padronizado pelo nosso grupo de pesquisa,³² na superfície volar medial do antebraço, onde foram aplicados os extratos de alérgenos (gota única), utilizando-se o conta-gotas, a uma distância de aproximadamente 2 cm, em sequência pré-determinada (1ª fila: histamina, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatofagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*; e 2ª fila: diluente, cão, gato, gramíneas, mofo, pólen). Foi utilizada uma pequena lanceta (PUNTOR®, com dispositivo plástico que limita o grau de penetração na pele) para cada alérgeno. Após 3

minutos, foi retirado o excesso de extrato com papel toalha, evitando-se “contaminar” os testes vizinhos. A leitura foi feita entre 15 e 20 minutos após a aplicação dos alérgenos. Na ausência de pápulas no teste com o diluente, a presença de pápulas com diâmetro ≥ 3 mm indicava teste positivo. O diagnóstico de asma de origem atópico era realizado naquele paciente com pelo menos uma sensibilização a alérgeno no teste cutâneo.

5.9 *Espirometria*

Os procedimentos técnicos e os critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade para a realização dos exames de função pulmonar seguem as recomendações da *American Thoracic Society – European Respiratory Society (ATS/ERS)*.^{6,9} Todas as medidas foram corrigidas de acordo com a pressão barométrica local e com a temperatura do dia em que foram realizados os testes. As espirometrias foram realizadas em cada visita. Os seguintes parâmetros foram avaliados: capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), relação da razão VEF_1/CVF e o fluxo expiratório forçado entre 25% e 75 % da capacidade vital forçada ($FEF_{25-75\%}$). A espirometria é realizada individualmente, na posição sentada e com uso de clipe nasal, através do espirômetro *Vmax Encor 22-Sensormedics (San Diego, California, USA)*. Todos os participantes realizaram no mínimo três manobras de expiração forçada e a escolha da melhor curva é realizada pelo próprio software ou pelo técnico quando pertinente. Após, os pacientes receberam 400 μ g de salbutamol inalado, com uso de espaçador, e aguardaram 15 minutos para repetir novamente as curvas espirométricas (no mínimo três manobras), visando avaliar a resposta ao uso de broncodilatador.³³ Para melhor visualização dos resultados, os valores espirométricos são expressos em valores absolutos e escore-z.²⁶ Desta forma, foram considerados normais os valores de VEF_1 , CVF e VEF_1/CVF maiores de -1,645 (expressos em escore-z).

5.10 *Escarro induzido*

O exame de EI foi realizado uma na visita 1 em todos os pacientes, e no final do estudo apenas nos pacientes com AGRT. O escarro foi processado de acordo com a técnica adaptada descrita por Pizzichini et al.²⁴. Resumidamente, o procedimento foi iniciado 15 minutos após a administração de 400 μ g de salbutamol inalado. As amostras são obtidas através da inalação de solução salina, em uma concentração de 4,5%, com 4 repetições de 5 minutos de inalação, sucessivamente, até a obtenção do escarro. Para a nebulização da solução salina utilizou-se um nebulizador ultrassônico de alto débito (Ultra-Neb 2000, DeVilbiss-Sunrise Medical, S4.10omerset, Pennsylvania, USA). Após cada período de

inalação, o VEF₁ foi verificado para garantir a segurança do teste. O procedimento era interrompido se houvesse uma queda de VEF₁ ≥ 15% em relação ao valor basal da espirometria. O EI era repetido nos pacientes com AGRT com pelo menos 6 meses de intervalo após o primeiro exame.

5.11 *Análise do escarro*

No escarro foi realizada a contagem celular total de leucócitos, utilizando-se uma Câmara de Neubauer espelhada (*Boecco, Germany*). As lâminas para exame citológico diferencial foram citocentrifugadas a 500 rpm, por 5 minutos. Então, 400 células foram contadas por um examinador experiente.²⁴ Os resultados foram expressos como percentual do tipo de célula contada. As amostras obtidas foram consideradas adequadas se a contagem celular total apresentasse contaminação por células escamosas da orofaringe inferior a 20% no exame citológico diferencial. Os escarros com células epiteliais escamosas ≤20% foram classificados como: pauci-granulocítico (<2,5% eosinófilos e <54% de neutrófilos), eosinofílico (≥2,5% eosinófilos e <54% de neutrófilos), neutrofílico (<2,5% eosinófilos e ≥54% de neutrófilos), ou misto (≥2,5% eosinófilos e ≥54% de neutrófilos).

5.12 *Análise estatística*

Para análise descritiva, os dados categóricos foram apresentados através de frequências absolutas e relativas. As descrições das variáveis contínuas foram apresentadas por média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil, conforme sua distribuição. A comparação das variáveis entre os grupos ou períodos de avaliação foi realizada através dos testes qui-quadrado (variáveis categóricas) e do teste *t de Student* ou *Mann-Whitney* (variáveis quantitativas). Todas as análises foram realizadas no programa SPSS 20.0. Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 **Ética**

Este projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, sob o número CAAE 91092218.1.0000.5336. Todos os responsáveis e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e o termo de assentimento (TCLE e TA), após a leitura realizada pelos pesquisadores envolvidos no estudo. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos,

conforme Resolução n. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à dignidade dos voluntários.

Os procedimentos realizados podem causar dispneia, opressão torácica, broncoespasmo e cefaleia durante ou após os testes propostos no presente estudo. No entanto, esses sintomas são considerados raros em crianças e adolescentes de acordo com as diretrizes internacionais e também são caracterizados como seguros. Além disso, os pesquisadores forneceram todo o suporte necessário para estabelecer o quadro prévio estável do participante antes da liberação dos mesmos.

7 Resultados

Foram incluídos no estudo 103 sujeitos (Figura 1), divididos em dois grupos ALM (n=75) e AGRT (n=28), com idade média de $11,4 \pm 1,4$ anos e $10,9 \pm 3,1$ anos, respectivamente, e sem diferenças significativas de gênero. Mais de 90% dos pacientes, em ambos os grupos são atópicos, com prevalência de sensibilização a *B. tropicalis* significativamente maior nos pacientes com ALM (Tabela 1).

Tabela 1: Características dos sujeitos incluídos

Variáveis	ALM (n=75)	AGRT (n=28)	P
Idade, anos	11.4 ± 1.4	10.9 ± 3.1	0,5
Gênero, masculino	41(54)	13 (46)	0,45
Uso de Omalizumabe	NA	17 (60)	-
Atopia*	57 (96)	25 (100)	0,21
<i>D. pteronyssinus</i>	50 (84)	14 (56)	0,23
<i>D. farinae</i>	49 (83)	14 (56)	0,29
<i>B. tropicalis</i>	48 (81)	11 (44)	0,04
Gramíneas	6 (10)	4 (16)	0,26
Mofo	4 (7)	2 (8)	0,65
Barata	47 (79)	21 (84)	0,93
Gato	6 (10)	1 (4)	0,47
Cachorro	11 (18)	2 (8)	0,36
Asma controlada**	9 (14)	5 (22)	0,37
Obesidade	11 (15)	10 (36)	0,01

Variáveis expressas em média e desvio padrão ou número absoluto e percentual. NA: não se aplica, pois pacientes com ALM não tem indicação para uso de Omalizumabe. * Sujeitos que realizaram o teste de atopia e apresentaram reação a pelo menos um dos alérgenos no teste cutâneo (ALM n = 59 e AGRT n = 25); ** ALM (n=65) e AGRT (n=23), Obesidade: classificado segundo WHO.³⁴

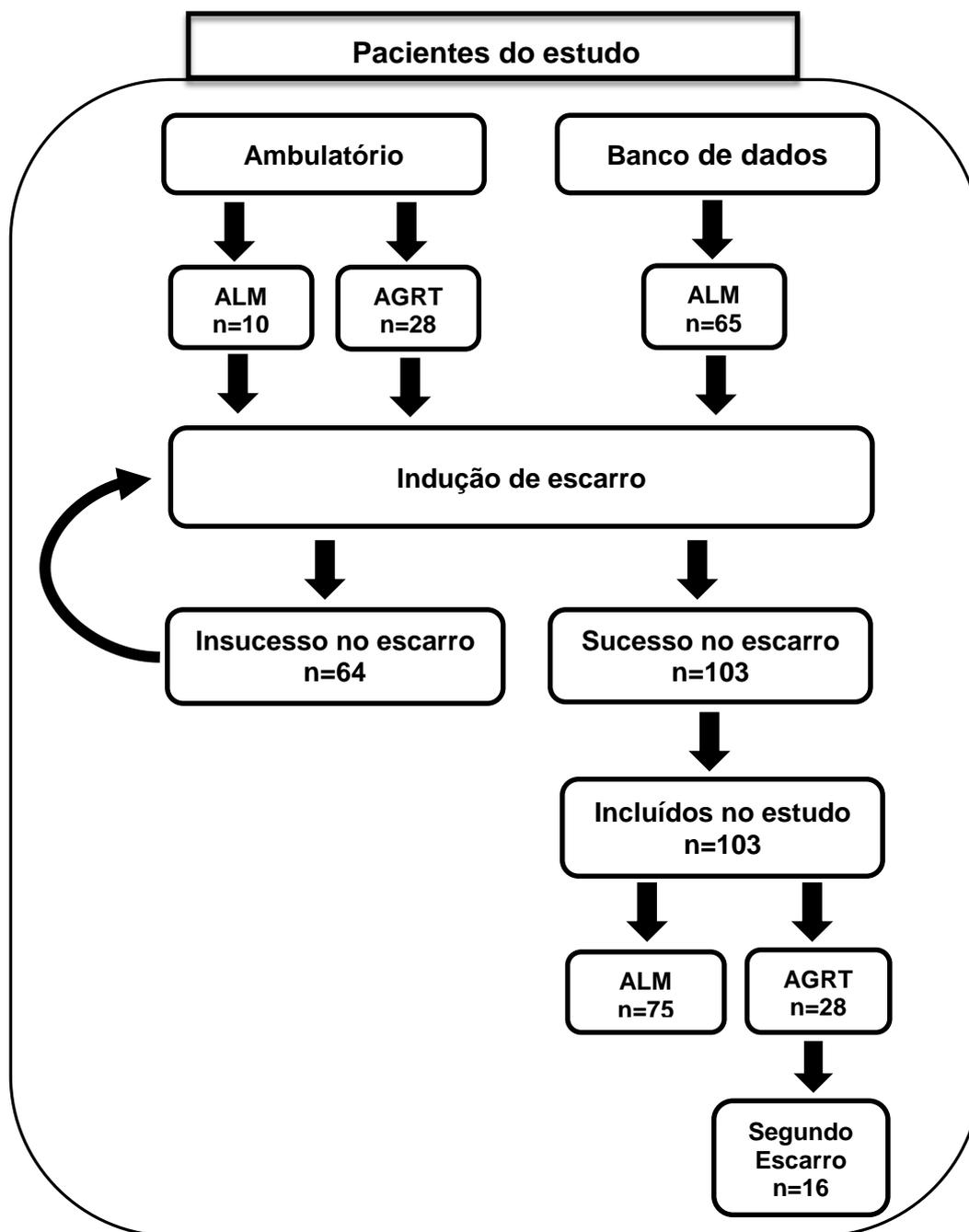


Figura 1: Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo; Ambulatório: Ambulatório de Asma do Hospital São Lucas da PUCRS; Banco de dados: pacientes de estudo realizado por nosso grupo anteriormente; ALM: asma leve a moderada; AGRT: asma grave resistente a terapia; Segundo escarro: pacientes do grupo AGRT que realizaram um segundo exame de escarro.

Foram realizados 183 procedimentos de escarro induzido, alcançando uma taxa de sucesso de 56,3%. O grupo de crianças com ALM apresentou a seguinte distribuição dos perfis inflamatórios no EI: 28% eosinofílico, 37,3% neutrofílico, 24% misto e 10,7% paucigranulocítico, enquanto o grupo AGRT apresentou 25% eosinofílicos, 25% neutrofílicos, 14,3% mistos e 35,7% paucigranulocíticos. Quando comparadas as distribuições dos fenótipos entre os grupos, foi evidenciada diferença para o fenótipo paucigranulocítico ($p=0,003$), conforme demonstrado na figura 2. Em relação ao controle da doença, não foram evidenciadas diferenças entre os grupos, conforme a figura 3.

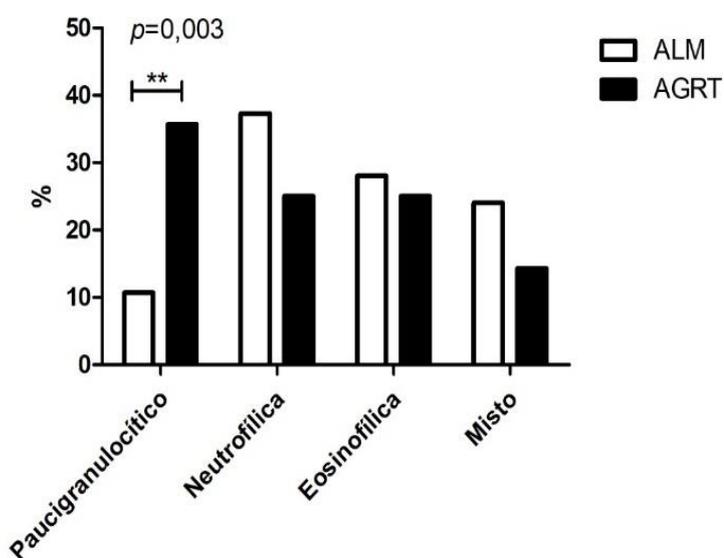


Figura 2: Perfil inflamatório no primeiro exame de escarro do grupo com asma leve a moderada (ALM, $n=75$) e asma grave resistente à terapia (AGRT, $n=27$).

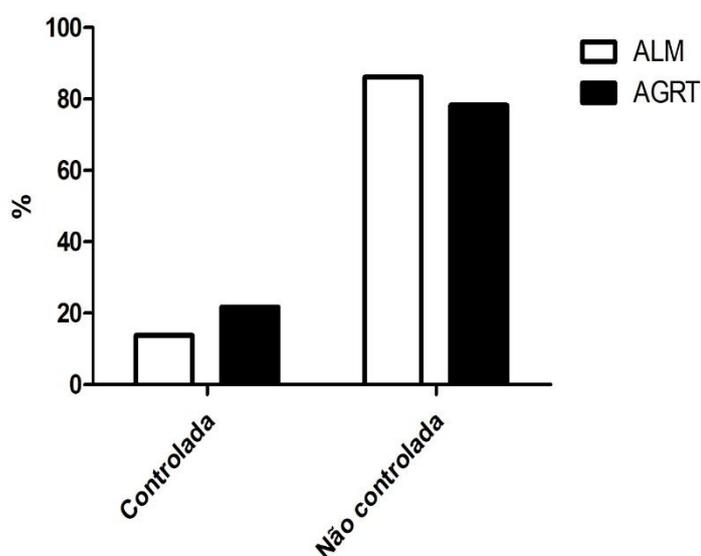


Figura 3: Percentual de pacientes com a doença controlada e não controlada segundo questionário de controle da doença da GINA; ALM: asma leve a moderada e AGRT: asma grave resistente à terapia.

Quando comparados os percentuais de células no escarro de ambos os grupos, foi evidenciada diferença estatisticamente significativa em relação aos neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Os pacientes com AGRT apresentaram maior percentual de macrófagos e linfócitos e menor percentual de neutrófilos do que os pacientes com ALM (Figura 4). Por outro lado, quando comparados os valores absolutos de células no escarro induzido entre os grupos ALM e AGRT, não foi evidenciada diferença significativa para nenhum tipo celular (Figura 5). Quando comparados os percentuais de células inflamatórias no escarro (eosinófilos e neutrófilos), foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos (Figura 6).

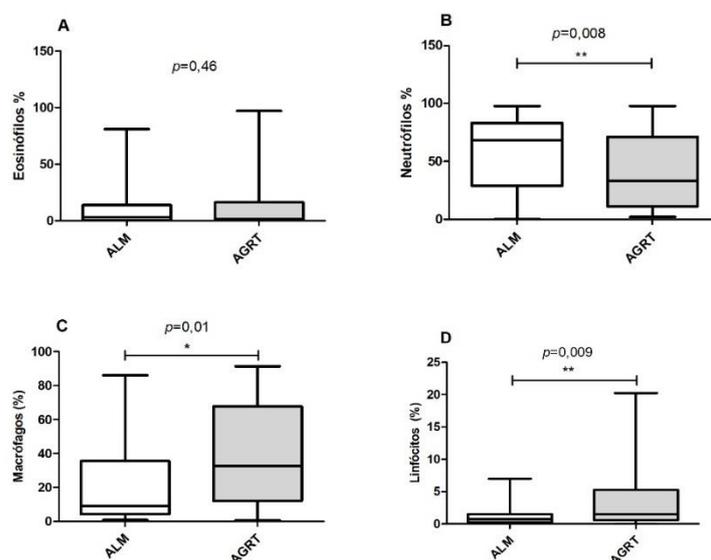


Figura 4: Percentual de células na primeira amostra de escarro de crianças com asma leve a moderada (ALM, n=75) e asma grave resistente à terapia (AGRT, n=28). A: eosinófilos; B: neutrófilos; C: macrófagos; D: linfócitos; resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

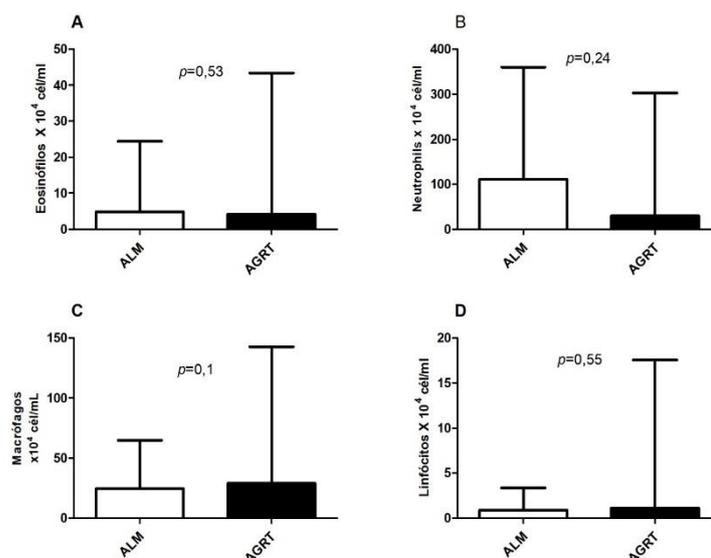


Figura 5: Número absoluto de células para cada tipo celular na primeira amostra de escarro de crianças com asma leve a moderada (ALM) e asma grave (AGRT). A: eosinófilos; B: neutrófilos; C: macrófagos; D: linfócitos. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

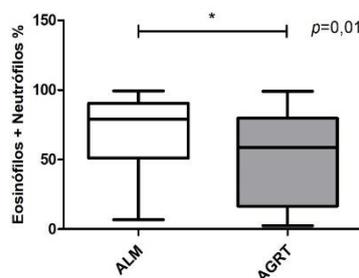


Figura 6: Comparação entre o percentual de células inflamatórias (eosinófilos e neutrófilos) no escarro induzido, entre os grupos asma leve a moderada (ALM) e asma grave (AGRT). Valores expressos em mediana e intervalo interquartil.

No intuito de dirimir o fator de confusão tratamento com Omalizumabe, dividimos o grupo AGRT em dois, pacientes com e sem tratamento com Omalizumabe, e comparamos cada um deles com o grupo ALM. Verificamos que ainda assim não há diferença entre o percentual de eosinófilos. Ao analisarmos pacientes em tratamento com Omalizumabe, foi evidenciada diferença significativa em relação ao percentual de neutrófilos ($p=0,007$) e macrófagos ($p=0,002$), por outro lado, quando analisamos os pacientes sem a utilização do Omalizumabe, essa diferença desaparece, conforme demonstrado na figura 7.

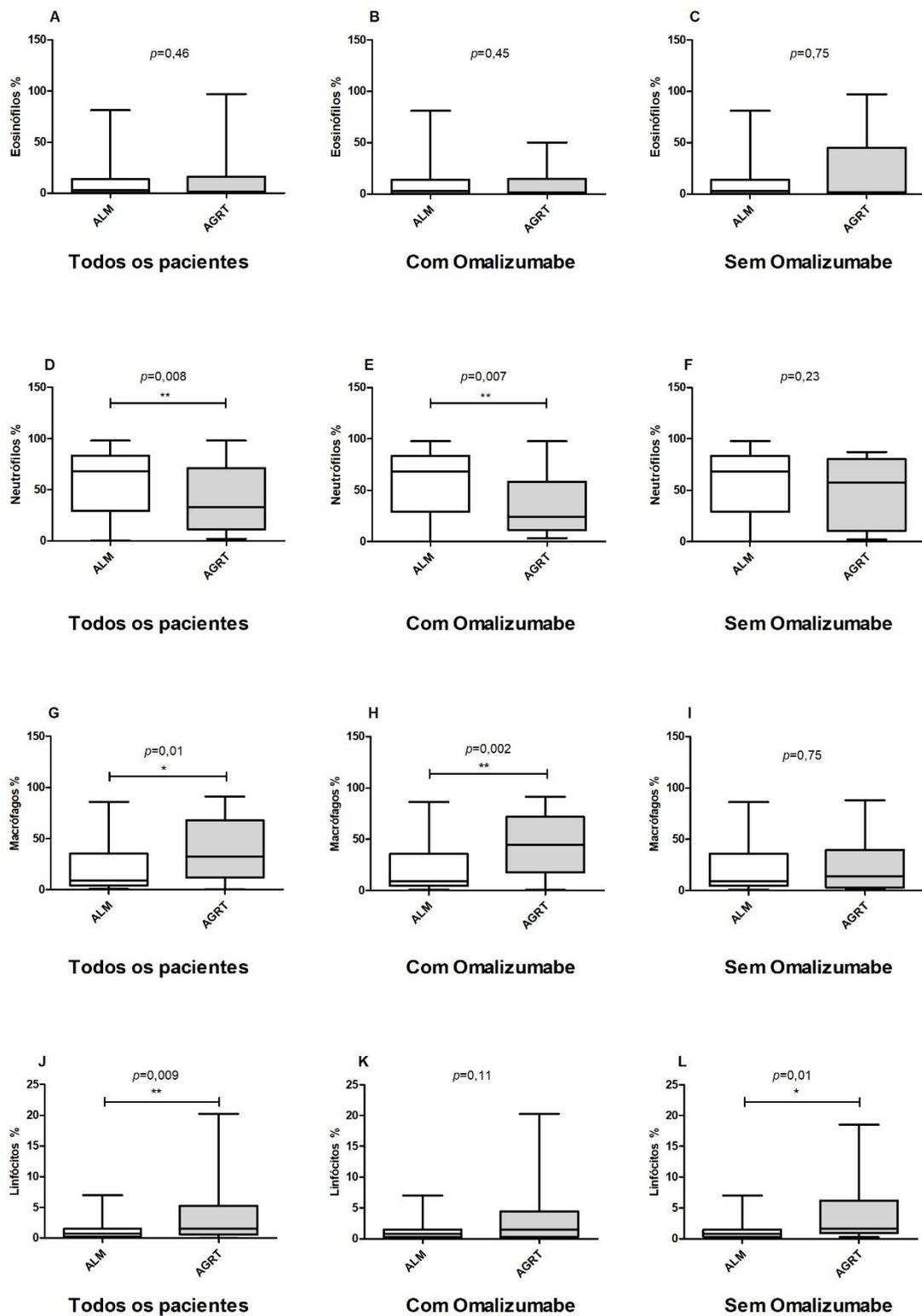


Figura 7: A, D, G e J, grupo AGRT com todos os pacientes; B, F, H e K, grupo AGRT com apenas pacientes em tratamento com Omalizumabe; C, E, I e L, grupo AGRT com pacientes sem tratamento com Omalizumabe; Percentual de eosinófilos em A, B e C; percentual de neutrófilos em D, E e F; percentual de macrófagos em G, H e I; percentual de linfócitos em J, K e L; resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Em relação as variáveis de espirometria, verificamos uma diferença significativa entre os grupos nos valores de VEF₁ ($p=0,02$), conforme demonstrado na Figura 8.

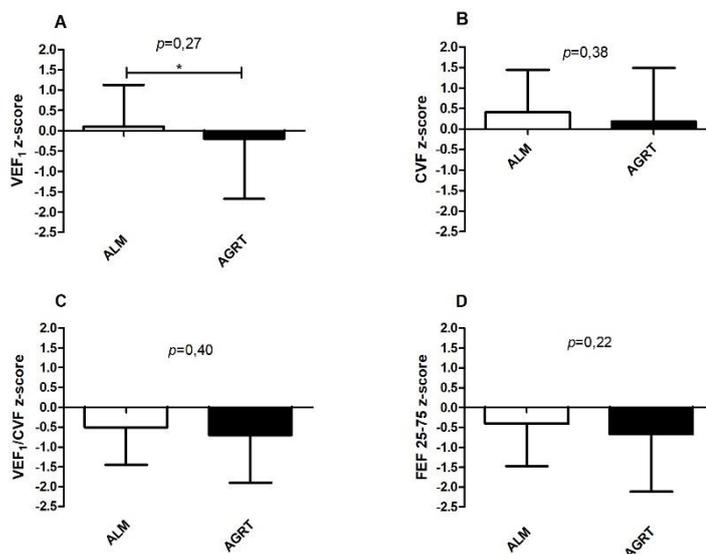


Figura 8: Comparação entre as variáveis de espirometria, entre os grupos com asma leve a moderada (ALM, n= 65) e asma grave resistente à terapia (AGRT, n=26); A: VEF₁; B: CVF; C: VEF₁/CVF; D: FEF 25%-75%. Valores expressos em escore-z, média e desvio padrão.

Quando analisados apenas pacientes com função pulmonar alterada ($n=12$, $VEF_1/CVF < -1,645$ score-z)²⁶, independente da gravidade da doença, correlacionando com os valores absolutos de neutrófilos no escarro induzido, foram evidenciadas correlações inversamente significativas com o VEF₁ ($r = -0,83$, $p = 0,0007$), CVF ($r = -0,75$, $p = 0,004$) e FEF 25-75 ($r = -0,88$, $p = 0,0001$), conforme apresentado a Figura 9.

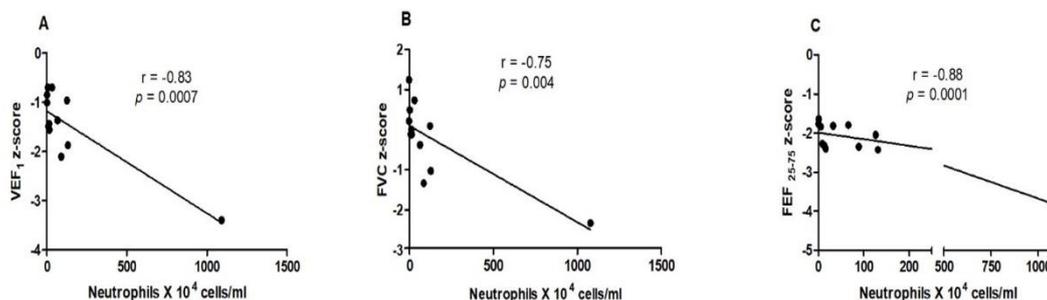


Figura 9: Análise de correlação entre a espirometria e os valores absolutos de neutrófilos no escarro induzido dos pacientes com teste de espirometria alterada (GLI 2012).²⁶ A: VEF₁ e números absolutos de neutrófilos, $r=-0,83$, $p=0,0007$; B: CVF e número absoluto de neutrófilos, $r=-0,75$, $p=0,004$; C: FEF 25-75, $r=-0,88$, $p=0,0001$; $n=13$ (AGRT com $n=5$ e ALM com $n=8$).

Nas crianças com AGRT, com exames de escarro em dois momentos (n=16), a média de tempo entre cada exame foi de $10,19 \pm 4,16$ meses, onde 9 (53%) delas alteraram o fenótipo inflamatório. Mais da metade dos pacientes que mudaram o perfil inflamatório (55%), mudaram para um perfil paucigranulocítico (sem a presença de inflamação) e apenas um paciente mudou de um perfil não inflamatório (paucigranulocítico) para inflamatório (misto), conforme figura 10.

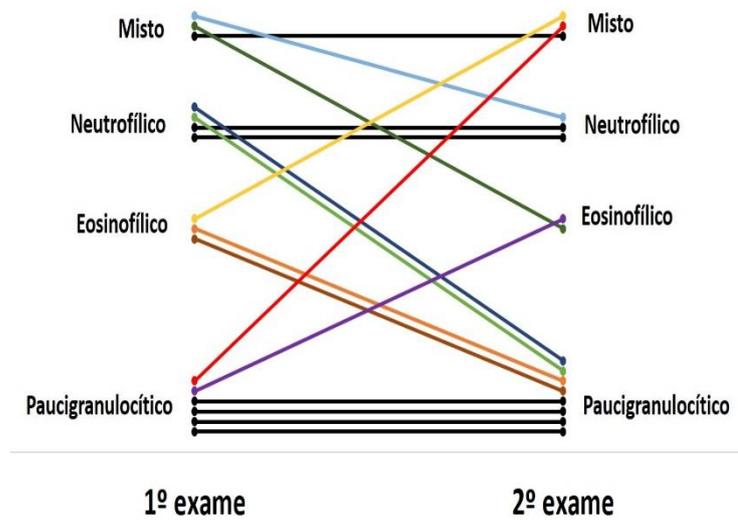


Figura 10: Perfil da inflamação no escarro induzido em pacientes com AGRT que realizaram duas induções de escarro com pelo menos seis meses de intervalo (n=16); 9 (56%) pacientes modificaram o perfil inflamatório do escarro no período estudado (barras com cor mostram os pacientes que modificaram o perfil do escarro).

8 Discussão

A asma grave, que acomete ao redor de 10% dos casos, é a apresentação da doença que resulta em maior morbimortalidade e custos para a sociedade em todo o mundo. A inflamação crônica das vias aéreas na asma é um importante marcador de atividade da doença, do padrão inflamatório e do fenótipo clínico.¹ O escarro induzido na asma tem sido amplamente utilizado em pesquisa, especialmente na última década. Por ser um método não invasivo e seguro, tem permitido avaliar a inflamação das vias aéreas inferiores em crianças (> 6 anos), adolescentes e adultos com asma.¹⁶ Crianças e adolescentes com AGRT são pacientes que resultam em um grande desafio clínico para o médico especialista, com pobre resposta à terapia convencional com medicação inalatória e/ou corticoide oral contínuo.¹ Esse grupo de pacientes tem sido melhor estudado nos últimos anos, mas ainda com pouco conhecimento do padrão e comportamento da inflamação das vias aéreas, principalmente em populações de países em desenvolvimento. Este é o primeiro estudo que avalia as características inflamatórias do escarro induzido e seu comportamento ao longo do tempo em pacientes pediátricos com AGRT, em um centro de referência no Brasil, comparando com pacientes com asma menos grave.

Os pacientes com AGRT e ALM selecionados neste estudo não apresentaram diferenças significativas em relação a idade e gênero. A grande maioria dos pacientes, em ambos os grupos, são atópicos (>95% dos casos). A sensibilização para *B. tropicalis* foi significativamente maior nos pacientes com ALM, cujo resultado parece ser de causa aleatória devido a amostra menor de pacientes do estudo. Por outro lado, os pacientes com AGRT apresentaram uma frequência significativamente maior de obesidade. Uma hipótese para este achado seria que este grupo de pacientes mais graves são mais sedentários, mas esta questão não foi avaliada no estudo.

Nossos resultados principais mostraram que o padrão de inflamação (eosinofílico, neutrofílico e misto) no EI em pacientes pediátricos com AGRT não diferem de pacientes com asma menos grave (ALM). No entanto, os pacientes com AGRT apresentaram com mais frequência resultados do EI sem inflamação ($p=0,003$; Figura 1) e menor número de neutrófilos e maior número de macrófagos e linfócitos (Figura 2), quando comparados ao grupo ALM. Maior número de EI sem inflamação e menor número de neutrófilos na via aérea podem ser explicados por duas questões.

Em primeiro lugar, os pacientes do grupo AGRT são acompanhados em um centro de referência terciário, com consultas periódicas, com revisão da técnica inalatória e adesão ao tratamento, e a maioria dos pacientes com ALM (78%) foram selecionados em escolas públicas em um estudo transversal, sem controle do acompanhamento e uso de medicações. Em segundo lugar, e ainda mais importante, a maioria dos pacientes com AGRT (60%) estavam em tratamento com o imunobiológico anti IgE (Omalizumabe). De acordo com estudo publicado anteriormente por nosso grupo de pesquisa nesta mesma amostra de pacientes com AGRT, pacientes em tratamento com Omalizumabe aumentaram em 90% o controle da doença.³⁵ Além disso, o uso de Omalizumabe resulta em diminuição de eosinofilia, tanto nas vias aéreas, quanto em sangue periférico,³⁶ e a melhora da adesão ao tratamento e técnica inalatória pode resultar em melhor controle da doença.³⁷ Outro estudo em pacientes adultos com asma e DPOC mostraram que, após 12 meses de tratamento com Omalizumabe, houve uma redução significativa do percentual de neutrófilos e eosinófilos, e aumento do percentual de macrófagos no sangue periférico.³⁸ Desta forma, o acompanhamento clínico e tratamento medicamentoso não controlados nos pacientes com ALM, e o uso otimizado e rigoroso dos fármacos preconizados para AGRT no centro de referência, incluindo o Omalizumabe, pode explicar a maior presença de inflamação das vias aéreas nos pacientes com ALM. Esta nossa hipótese é reforçada quando analisamos a inflamação das vias aéreas em pacientes com AGRT que não estão em tratamento com Omalizumabe (40%) e comparamos com o grupo ALM, e não evidenciamos diferença significativa para nenhum tipo celular entre os grupos (figura:7).

Outro fator analisado em relação ao padrão inflamatório das vias aéreas foi função pulmonar. Mostramos que pacientes com AGRT possuem valores de VEF₁ significativamente menores que os pacientes com ALM. Valores mais baixos de VEF₁ estão associados com aumento da gravidade da asma.³⁹ Além disso, nossa amostra encontrou mais indivíduos obesos no grupo AGRT, que pode também estar associado a este achado.⁴⁰ Quando avaliamos a relação da função pulmonar com o EI, observamos uma forte e significativa correlação inversa entre o número absoluto de neutrófilos e variáveis da função pulmonar, somente naqueles pacientes com função pulmonar alterada. Neutrófilos podem levar ao estreitamento das vias aéreas devido a inflamação, e como consequência de remodelamento, associado a liberação de TGF- β (citocina “pró-fibrose” tecidual)⁴¹. Outro marcador associado a inflamação

neutrofílica é a elastase neutrofílica, protease que atua na matriz extracelular causando danos aos pulmões, e que possui associação inversa com as variáveis de espirometria.⁴²

Por fim, avaliamos ainda um aspecto muito pouco estudado em pacientes pediátricos com AGRT. Em uma subamostra do grupo AGRT, na repetição do exame do escarro em um intervalo de no mínimo 6 meses, a mudança do padrão inflamatório do EI ocorreu 9/16 (56%) dos casos. Além disso, mesmo em uma amostra pequena de pacientes, não consegue se observar nenhum padrão característico de mudança de “fenótipo” inflamatório das vias aéreas (Figura 6). Este padrão de comportamento de inflamação difere da asma grave em adultos, que se apresenta de forma mais estável.⁹ Este nosso achado foi demonstrado previamente unicamente por Fleming e colaboradores, encontrando o mesmo resultado em crianças com asma grave, com uma grande instabilidade no padrão neutrofílico (mudança do fenótipo inflamatório em 63% dos casos).¹⁸ Esta característica de flutuação do padrão inflamatório das vias aéreas em crianças com asma grave merece ser melhor estudada e pode ser um fator para explicar dificuldades em utilizar outros marcadores de inflamação (ex: FeNO) na prática clínica.⁹

O presente estudo apresenta duas limitações principais. A primeira é a questão de uma amostra de conveniência pequena do grupo de pacientes com AGRT. Este é uma questão difícil de modificar, sabendo que esta apresentação é infrequente, alocada somente em poucos centros de referência terciários, e que necessitaria de estudos multicêntricos com protocolos clínicos bem padronizados para realização de estudos maiores. A segunda limitação refere-se a uso aumentado de Omalizumabe no grupo AGRT. Reconhecemos que este pode ser um fator que modifica os resultados do escarro induzido nesses pacientes, mas no cenário de estudos de vida real tão valorizados atualmente, que inclui a característica do nosso estudo, acreditamos que esta limitação não reduz a importância dos nossos achados.

9 Conclusão

Demonstramos pela primeira vez as características da inflamação das vias aéreas inferiores em crianças com asma grave resistente à terapia, comparando com pacientes com asma leve a moderada. Incluindo, ainda, avaliação longitudinal dos padrões de inflamação em um período de curto prazo, em uma população de um país em desenvolvimento. Nossos achados mostram que pacientes pediátricos com AGRT não apresentam um padrão inflamatório diferente dos pacientes com asma mais leve, sugerem que a inflamação neutrofílica possa estar envolvida na piora da função pulmonar, e confirmam que a maior parte dos pacientes com asma grave modifica com o tempo o padrão de inflamação das vias aéreas inferiores.

10 Anexo I

Comprovante de aceite para revisão do artigo original

21/05/2019

E-mail de PUCRS - Respiriology RES-19-404



Rodrigo Godinho De Souza <rodrigo.godinho@acad.pucrs.br>

Respirology RES-19-404

Respirology Managing Editors <onbehalf@manuscriptcentral.com>

20 de maio de 2019 21:45

Responder a: respirology@resphealth.uwa.edu.au

Para: rodrigo.godinho@acad.pucrs.br

Cc: rodrigo.godinho@acad.pucrs.br, crison@gmail.com, joao.heinzmann@pucrs.br, laaisbridi@yahoo.com, alineacunha@hotmail.com, keilaabreu18@gmail.com, gessica.antunes@acad.pucrs.br, mhjones@pucrs.br, leonardo.pinto@pucrs.br, rstein@pucrs.br, ppitrez70@gmail.com

20-May-2019

RES-19-404 - Sputum inflammatory phenotypes in Brazilian children with severe asthma are similar to milder asthma and longitudinally unstable.

Dear Dr. de Souza
CC: all authors

For your information, your manuscript above has now been checked by the Editorial Office and complies with our requirements.
It is now ready to proceed to the first step of the review process at Respirology.

Please find attached the PDF proof of the latest submitted version of your manuscript for your record.

Sincerely,
The Editorial Office team.
Respirology
respirology@resphealth.uwa.edu.au
de Souza de Souza

 PDF Proof.PDF
1457K

10 Anexo II

Artigo Original

Title: Sputum inflammatory phenotypes in Brazilian children with severe asthma are similar to milder asthma and not stable.

Authors: Rodrigo Godinho de Souza¹, Cristian Roncada², João Paulo Heinzmann-Filho³, Laís Bridi¹, Aline Andrea da Cunha⁴, Keila Abreu¹, Géssica Luana Antunes¹, Marcus H. Jones¹, Leonardo Araújo Pinto¹, Renato Tetelbom Stein¹, Paulo Márcio Pitrez⁵

¹ Infant Center, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

² Faculdade da Serra Gaúcha (FSG)

³ Centro Universitário Cenecista de Osório (UNICNEC)

⁴ Infant Center, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS); Hospital Moinhos de Vento (HMV)

⁵ Infant Center, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS); Hospital Moinhos de Vento (HMV), Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Corresponding author: Paulo Márcio Pitrez. Rua Ramiro Barcelos, 630/917; CEP 90410-010; Porto Alegre, RS; Brazil. Phone: 55 51 3537 8598.

Number of abstract words: 250

Number of words in the paper: 2492

Abstract

Aims: To compare the sputum inflammatory phenotype characteristics between school-aged children with severe therapy-resistant asthma (STRA) and mild to moderate (MMA) asthma, assessing the stability of the airway inflammatory profile in STRA patients over time. **Methods:** Patients 6-17 years of age with the diagnosis of STRA and MMA were recruited from a tertiary center outpatient clinic and from public schools. The diagnosis of STRA or MMA were made according to internationally established criteria. Control of disease was assessed, and lung function test with induced sputum was performed in all patients. Induced sputum was repeated between 6-18 months after the first procedure. **Results:** Patients with STRA (n=28) did not present a distinct inflammatory pattern compared to patients with MMA (n=75), although STRA patients showed a significantly higher number of paucigranulocytic sputum tests ($p=0.003$). We have also found a significant negative correlation between forced expiratory volume in the first second (FEV_1) ($r = -0.83$, $p=0.0007$), forced vital capacity (FVC) ($r = -0.75$, $p=0.004$) and forced expiratory flow between 25% and 75% of FVC (FEF_{25-75}) ($r = -0.88$, $p=0.0001$) and the number of sputum neutrophils in patients with abnormal spirometry. Finally, 9/16 (56%) of the STRA subjects who repeated the induced sputum test showed a different inflammatory phenotype. **Conclusion:** The inflammatory phenotype of the induced sputum in children with asthma is not associated with the severity of disease. However, the inflammatory pattern of sputum in children with STRA is unstable over time, and neutrophils may play a role in the worsening of lung function.

Keywords: Induced sputum; Spirometry; Airway inflammation; Children.

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease of the lower airways, with high prevalence and morbidity, especially in children.¹ Severe asthma is a major clinical and public health problem worldwide, particularly in developing countries. It is estimated that 5% to 10% of all asthmatic children have severe asthma, requiring high doses of inhaled corticosteroids associated with bronchodilators, with poor control of disease and high cost to the health systems.² In children, the term severe therapy-resistant asthma (STRA) has been used and is the most severe spectrum of the disease, with frequent asthma symptoms, school loss, emergency visits and hospitalizations, leading to a significant impairment of quality of life.³ This group of patients does not respond adequately to the inhaled drug therapies, even with optimization of the clinical management, usually requiring biologic therapies.^{2, 4}

Few tertiary centers around the world are studying the clinical characteristics, response to treatments and the pattern of airway inflammation of children with STRA. The clinical characteristics of children with STRA seem to be similar among different levels of population disparities. Brazilian children with STRA seem to have the same clinical characteristics (eg. atopic prevalence and mild lung function compromise) of English and French children.⁵⁻⁷ However, airway inflammation in children with STRA is still poorly understood among different populations. Airway inflammation in asthmatic children may be assessed through flexible bronchoscopy (bronchoalveolar lavage and bronchial biopsy) or induced sputum, and both methods represent different airway compartments.⁸⁹ Although labor intensive, induced sputum has been more commonly used to study airway inflammation in children because it is not an invasive procedure compared to flexible bronchoscopy.

The use of induced sputum for the evaluation of airway inflammation has provided a great advance in understanding the pathophysiology of respiratory diseases in children, particularly asthma.¹⁰ In induced sputum of asthmatic patients, lower airway inflammation has been classified in four distinct patterns: eosinophilic, neutrophilic, paucigranulocytic and mixed.^{11, 12} However, the use of this diagnostic tool in children with STRA has not been widely reported. The heterogeneity of sputum inflammatory phenotypes in children

with STRA has been demonstrated in different countries, regardless of the economic development, usually with no inflammation present (paucygranulocytic).^{5, 13-15} In addition, unlike adult asthmatics, the inflammatory profile seems to vary over time.¹⁴ However, most of the reports were not controlled by severity and were cross-sectional. Our study is the first report to compare the lower airway inflammatory phenotype characteristics between school-aged children with STRA (STRA) and mild to moderate (MMA) asthma, assessing the stability of the airway inflammatory profile in STRA patients, in a population from a low-middle income country.

Methods

Subjects

School-aged children (6-17 years) with STRA and MMA were selected based on the medical records of our pediatric asthma outpatient clinic. Children with ALM were also selected from a database of another cross-sectional study carried out by our research group in public schools, geographically near to our tertiary center.¹⁶ The diagnosis of the STRA and MMA patients was according to the criteria of the International American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) Guidelines of Severe Asthma² and to the Global Initiative for Asthma (GINA), respectively.¹ Briefly, patients with STRA required GINA step 4-5 medications (inhaled corticosteroids (ICS) with long-acting beta-2 agonists associated with other controller medication) to prevent the disease from becoming uncontrolled or cases that remained uncontrolled (poor symptom control, >2 severe/serious exacerbations in the previous year, or persistent airflow limitation) despite optimized therapy. Patients with MMA required a medical diagnosis of asthma needing a GINA step 1 or 2 treatment.¹ STRA children with modifiable factors that could not be addressed during clinical follow-up (eg, nonadherence to treatment, inadequate inhalation technique, relevant environmental factors, or treatable comorbidities) or any subject who had chronic diseases or cognitive impairment were excluded. One short and standardized clinical questionnaire and the GINA questionnaire for control of disease were applied.¹ For the classification of obesity, we used the body mass index (BMI) and the World Health Organization (WHO) classification.¹⁷

Allergen sensitization

For allergen sensitization tests, skin prick test was performed in the patients from our tertiary outpatient clinics¹⁸, and blood was collected for aeroallergen specific IgE (>0.35 kU/L; ImmunoCAP; Phadia AB, Sweden) analysis for the children recruited from public schools. The same allergen panel for both methods was used (house dust mites, cockroach, dog, cat, grasses, mold, and pollen), and the diagnosis of atopic asthma was determined by the presence of at least one positive test for some allergen.

Spirometry

The technical procedures of pulmonary function tests followed the recommendations of the ATS/ERS Guidelines.^{2, 19} Spirometry was performed at the induced sputum visit. The following parameters were evaluated: forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in the first second (FEV₁), FEV₁/FVC ratio and forced expiratory flow between 25% and 75% of FVC (FEF_{25-75%}). Spirometry was performed individually, in a seated position, and using a nasal clip, through the *Vmax Encor 22-Sensormedics spirometer* (San Diego, California, USA). All participants performed at least three forced expiration maneuvers, and the best curve was chosen. The spirometric values were expressed by z-score (GLI 2012 reference values) and abnormal lung function was classified when values of FEV₁/FVC were lower than -1.645 (expressed as z-score).²⁰

Induced sputum procedure and analysis

Induced sputum test was performed in all patients, but was repeated only in the STRA children, between 6-18 months of follow-up. The sputum was processed according to the technique described by Pizzichini et al.¹² The procedure was started 15 minutes after the administration of 400 µg of inhaled salbutamol. Samples were obtained by four nebulizations (Ultra-Neb 2000, DeVilbiss-Sunrise Medical, Pennsylvania, USA), every 5 minutes, with 4.5% saline solution, until the sputum was obtained. FEV₁ was measured after each inhalation to ensure the safety of the test. The procedure was interrupted if a fall in FEV₁ ≥ 15% from baseline spirometry was detected. Sputum was immediately separated and diluted into phosphate-buffered saline (PBS) and dithiothreitol (DTT) and

filtered with a 60- μ m filter. After centrifugation (2,000 rpm for 2 min.), the supernatant was removed, and the precipitate was resuspended in 1 mL of PBS.

Samples were then cytospinned (500 rpm, 5 minutes) and stained with May-Grumwald Giemsa. Four-hundred cells were counted, and differential cells were expressed as a percentage of each cell type. The samples were considered adequate when the squamous cells of the oropharynx were lower than 20% of the total cells counted. Adequate sputum were then classified as: paucigranulocytic (<2.5% eosinophils and <54% neutrophils), eosinophilic (\geq 2.5% eosinophils and <54% neutrophils), neutrophilic (< 2.5% eosinophils and \geq 54% neutrophils), or mixed granulocytic (\geq 2.5% eosinophils and \geq 54% neutrophils).¹¹

Statistical analysis

For descriptive analysis, the categorical data were presented through absolute and relative frequencies. The description of the continuous variables was presented by mean and standard deviation or median and interquartile range, according to their distribution. Comparison of the variables between the groups or time of assessment was performed using chi-square tests (categorical variables) and Student's t-test or Mann-Whitney test (quantitative variables). All tests were bidirectional, and the differences were considered significant for a $p < 0.05$.

Ethics

Our study was approved by our Research Ethics Committee under the CAAE # 91092218.1.0000.5336. All the parents and patients signed the informed consent form (CF) and the term of assent (TA).

Results

We have included 103 subjects (MMA: $n=75$, and STRA: $n=28$). Of the patients with MMA, 9 (12%) of the patients were recruited in our outpatient clinic and 66 (88%) were recruited from public schools. Characteristics of the patients are presented in Table 1. Most of the patients were sensitized to aeroallergens. FEV₁ was lower ($p=0.02$) and the prevalence of obesity was higher ($p=0.01$) in patients with STRA (Table 1).

Table 1: Characteristics of the subjects included in the study.

Variables	MMA (n=75)	STRA (n=28)	p
Age, years	11.4 ± 1.4	10.9 ± 3.1	0.5
Gender, male	41 (54)	13 (46)	0.45
Use of omalizumab	NA	17 (60)	-
Atopy *	57 (96)	25 (100)	0.21
Controlled asthma**	9 (14)	5 (22)	0.37
FEV ₁	0.10 ± 1.03	-0.19 ± 1,48	0.02
Obesity	11 (15)	10 (36)	0.01

Variables expressed as mean and standard deviation or absolute and percentage numbers. NA: not applicable, as patients with MMA have no indication for use of omalizumab. FEV₁: forced expiratory volume in the first second. *Subjects who were sensitized to at least one allergen (MMA n=59; STRA n=25); **MMA (n=65) and STRA (n=23).

Our success rate for induced sputum was 56.3%. The distribution of the inflammatory phenotypes in both groups are shown in Figure 1. Children with STRA presented a higher paucigranulocytic profile (p=0.003).

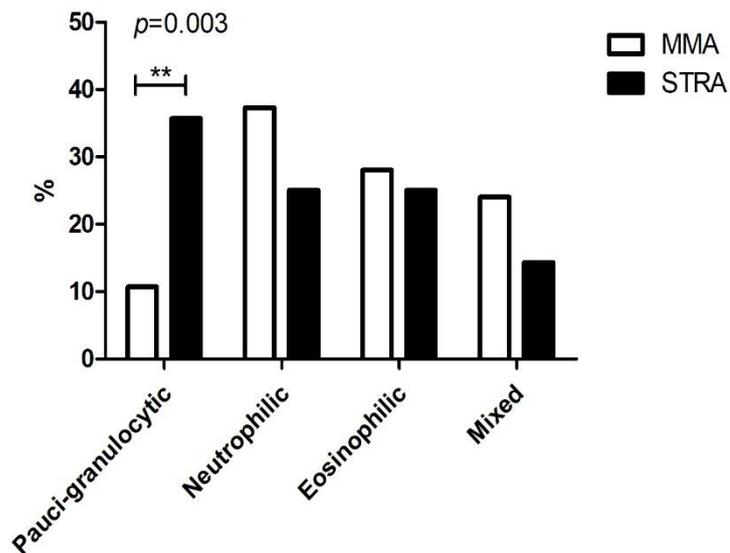


Figure 1: Inflammatory profile at the first sputum examination of the group with mild to moderate asthma (MMA: n=75) and severe therapy-resistant asthma (STRA: n=27).

When the percentages of cells in sputum were analyzed, we found that patients with STRA have a higher percentage of macrophages ($p=0.01$) and lymphocytes ($p=0.009$) than patients with MMA. On the other hand, children with MMA showed a higher percentage of neutrophils ($p=0.008$) than children with STRA (Figure 2). It is important to note that many children (60%) with STRA were under omalizumab treatment. When we analyzed omalizumab treatment separately, there was no difference between the inflammatory phenotypes between STRA and MMA groups. However, children with STRA treated with omalizumab showed a lower percentage of neutrophils ($p=0.007$) and a higher percentage of macrophages ($p=0.002$) in sputum, compared to the MMA group. This difference was not detected when children with STRA not treated with omalizumab was analyzed compared to children with MMA. If we consider both inflammatory cells (eosinophils and neutrophils) together in the analysis, we observed a significant reduction of granulocytes in the sputum of children with STRA ($p=0.01$), as shown in Figure 2.

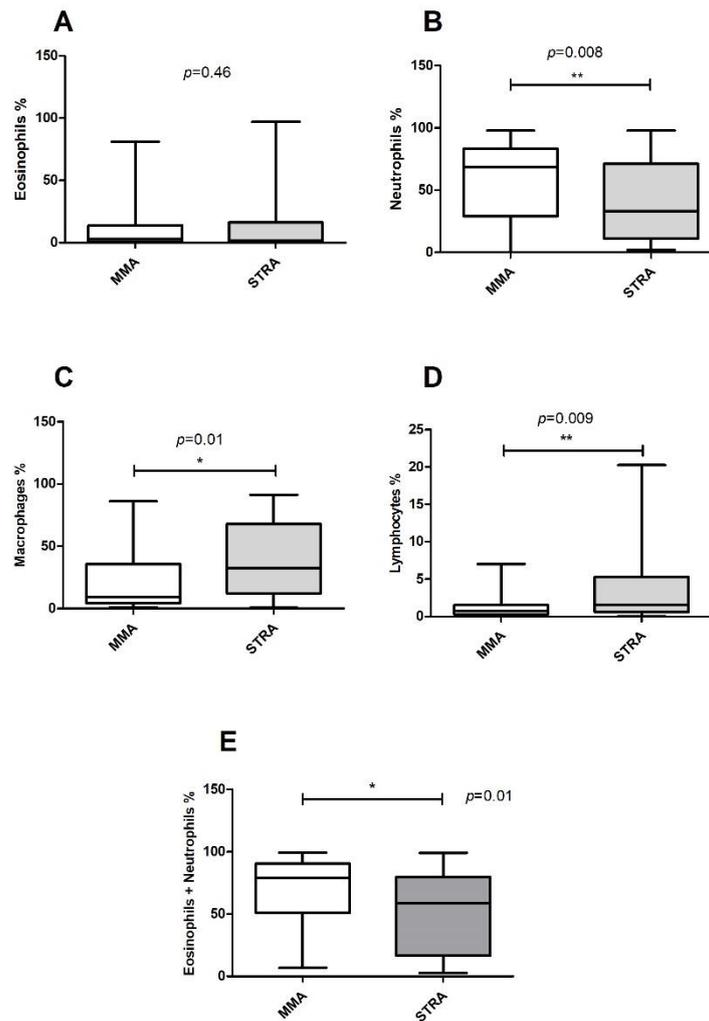


Figure 2: Percentage of each cell type in the first sputum sample of children with mild to moderate asthma (MMA: n=75) and severe therapy-resistant asthma (STRA: n=28). A: Eosinophils; B: Neutrophils; C: Macrophages; D: Lymphocytes. E: Comparison of the percentage of inflammatory cells (eosinophils and neutrophils) in induced sputum between MMA and STRA subjects. Values are expressed by median and interquartile range.

When the correlation of patients with abnormal lung function (MMA: n=8 and STRA: n=5; FEV₁/FVC < -1,645 z-score) and neutrophil counts in sputum were analyzed,²⁰ regardless of the severity of disease, a significant negative correlation was found (r= -0.83, p=0.0007), FVC (r= -0.75, p=0.004) and FEF₂₅₋₇₅ (r= -0.88, p=0.0001), as shown in Figure 3.

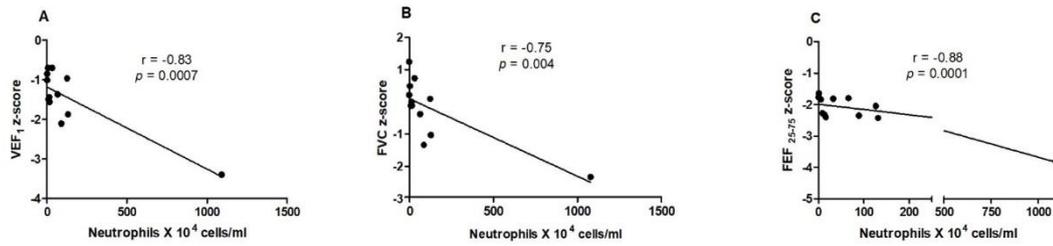


Figure 3: Correlation analysis between lung function and neutrophil counts in induced sputum of patients with abnormal spirometry test (GLI 2012).²⁰ A: FEV₁ and neutrophil counts, $r = -0.83$, $p = 0.0007$; B: FVC and neutrophil counts, $r = -0.75$, $p = 0.004$; C: FEF_{25-75%}, $r = -0.88$, $p = 0.0001$ (Severe therapy-resistant asthma: $n = 5$ and mild to moderate asthma: $n = 8$).

We have repeated the induced sputum in children with STRA ($n = 16$). The mean time between each test was 10.19 ± 4.16 months, and 9 (56%) patients showed changes in the inflammatory phenotype (Figure 4).

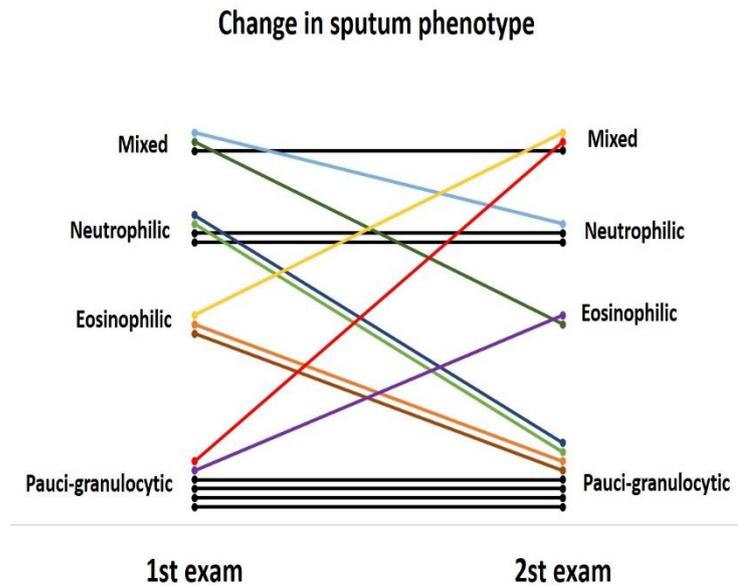


Figure 4: Profile of induced sputum inflammation in patients with severe therapy-resistant asthma (STRA) who underwent two induced sputum tests, between 6-18 months ($n = 16$). Nine (56%) patients changed the inflammatory profile of the sputum in this period (colored bars show the patients who modified the sputum profile).

Discussion

Severe asthma, which affects around 10% of cases, is the major presentation of the disease that results in increased morbidity and mortality, with high costs for societies. Chronic airway inflammation in asthma is an important marker of disease control and clinical phenotype.² For the assessment of airway inflammation in asthma, induced sputum has been widely used in research, especially in the last decade. Because it is a noninvasive and safe method, it allows the assessment of lower airway inflammation in school-aged children and adults with asthma.^{10, 21} Children and adolescents with STRA is a group of patients that result in a great clinical challenge in patient care, with poor response to conventional therapy (high doses of inhaled corticosteroids and long-acting bronchodilators).^{1, 22} The clinical characteristics of children with STRA has been reported from a few tertiary centers, but the pattern and clinical behavior of airway inflammation phenotypes, especially in populations from developing countries, are still poorly reported and understood. This is the first study that evaluates the inflammatory characteristics of induced sputum regarding the severity of disease and its behavior over time in pediatric patients with STRA compared to children with MMA from Southern Brazil.

Patients with STRA and MMA selected in our study did not present any difference in relation to age and gender, were mostly atopic (> 95% of cases), but patients with STRA had a significantly higher prevalence of obesity. One answer for this latest finding was not addressed in this study.

One of our major findings was that the prevalence of inflammatory phenotypes (eosinophilic, neutrophilic and mixed) from induced sputum in pediatric patients with STRA was not significantly different from patients with less severe asthma (MMA). However, patients with STRA showed a higher percentage of non-inflammatory induced sputum ($p=0.003$; Figure 1), lower numbers of neutrophils and higher numbers of macrophages and lymphocytes (Figure 2), when compared to the MMA group. The increased number of sputum tests with no inflammation and fewer neutrophils in the airways of children with STRA may have two explanations. Firstly, patients with STRA are followed up at a tertiary referral center, with periodic clinical visits, reviewing inhaled technique and adherence to treatment, and the majority of MMA patients (78%) were selected from public schools from one cross-sectional study, with no control of clinical follow-up and adherence to treatment. Secondly, and most importantly, the majority of patients with STRA (60%) were on anti-IgE treatment (omalizumab). According to one previous report from our group with the

same sample of patients with STRA, omalizumab treatment increased disease control by 90%.²³ In addition, the use of omalizumab results in decreased eosinophilia, both in the airways and in peripheral blood.²⁴ Our hypothesis is reinforced when the analysis of airway inflammation phenotypes are not different (including the paucigranulocytic phenotype) when patients with STRA who are not on omalizumab treatment (40%) were compared to children with MMA.

We also showed a significant negative correlation between the number of neutrophils in sputum and lung function in patients with abnormal spirometry. Neutrophils may lead to narrowing of the airways due to inflammation and airway remodeling, associated with the release of transforming growth factor- β (TGF- β).²⁵ Another marker associated with neutrophilic inflammation is neutrophilic elastase, a protease that acts on the extracellular matrix causing damage to the lungs, and has been also shown to be negatively associated with lung function variables.²⁶

One important clinical question is whether inflammatory phenotypes are stable in patients with asthma. In a subsample of our STRA group, we repeated the induced sputum test around one year after the first baseline test. In 9/16 (56%) of the cases, the inflammatory phenotype changed in this period. Moreover, even considering that the sample size is small for this analysis, no pattern of change in the inflammatory "phenotype" of the airways was observed (Figure 6). This pattern of inflammation behavior differs from severe asthma in adults, which seem to be more stable.¹¹ This finding was previously demonstrated only by one report in children with STRA from the United Kingdom, which found the same results of our study, but also showing a major instability in the neutrophilic pattern (63% of cases).¹⁴ This characteristic of inflammatory phenotype instability in children deserves to be better studied and may be one of the factors to explain difficulties in finding biomarkers of airway inflammation (e.g. FeNO) in clinical practice for asthmatic children.²

Our study has two main limitations. The first limitation is about the small sample from the group of patients with STRA. This is a difficult issue to address, considering that this clinical presentation is not common and that few tertiary centers have STRA protocols organized for research. Multicenter studies with an international network, following strict clinical protocols, are a major urgent need. The second limitation refers to the increased use of omalizumab in the STRA group. We acknowledge that this may be a factor that modifies the results of induced sputum in these patients, but in the scenario of the

importance of real-life studies today, in which our study is included, we believe that this limitation does not decrease the importance of our findings.

In conclusion, our study reports for the first time the characteristics of lower airway inflammation in children with STRA, compared to patients with milder asthma, including the pattern of longitudinal assessment of inflammation, from a population of a low-middle income country. Our findings show that pediatric patients with STRA do not present a different inflammatory pattern from patients with milder asthma, suggesting that neutrophilic inflammation may be involved in worsening of lung function and that most patients with severe asthma modify the pattern of inflammation of the lower airways in a short time period.

References:

1. GINA. Global Initiative for Asthma. 2019 GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2019 [cited 2019 14 de maio]. Available from: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/04/GINA-2019-main-Pocket-Guide-wms.pdf>.
2. Chung KF, Wenzel SE, Boulet L-P, Brightling C, Chané P, Dahlen S-E, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;43:343-73.
3. Bush A, Hedlin G, Carlsen KH, de Benedictis F, Lodrup-Carlsen K, Wilson N. Severe childhood asthma: a common international approach? *Lancet (London, England)*. 2008;372(9643):1019-21.
4. Lødrup Carlsen KC, Hedlin G, Bush A, Wennergren G, de Benedictis FM, De Jongste JC, et al. Assessment of problematic severe asthma in children. *Eur Respir J*. 2011;37(2):432-40.
5. Rodrigues AM. Características clínicas e fenotípicas de asma grave resistente à terapia em crianças brasileiras. *J Bras Pneumol*. 2015;41:343-50.
6. Gupta A, Dimeloe S, Richards DF, Chambers ES, Black C, Urry Z, et al. Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma. *Thorax*. 2014;69(6):508-15.
7. Deschildre A, Marguet C, Salleron J, Pin I, Rittié J-L, Derelle J, et al. Add-on omalizumab in children with severe allergic asthma: a 1-year real life survey. *Eur Respir J*. 2013;42(5):1224-33.

8. de Blic J, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Jaubert F, Scheinmann P, Gosset P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(1):94-100.
9. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, et al. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(4):974-82. e13.
10. Gibson P, Grootendorst D, Henry R, Pin I, Ryttila P, Wark P, et al. Sputum induction in children. *Eur Respir J.* 2002;20(37 suppl):44s-6s.
11. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology.* 2006;11(1):54-61.
12. Pizzichini E, Pizzichini M, Kidney J, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J.* 1998;11(4):828-34.
13. Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Wilson NM, Hansel TT, et al. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol.* 2005;39(4):318-24.
14. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax.* 2012;67(8):675-81.
15. O'brien CE, Tsirilakis K, Santiago MT, Goldman DL, Vicencio AG. Heterogeneity of lower airway inflammation in children with severe-persistent asthma. *Pediatr Pulmonol.* 2015;50(12):1200-4.

16. de Araújo PD, de Souza APD, Stein RT, Porto BN, Antunes L, Godinho R, et al. Distinct patterns of CD4 T-cell phenotypes in children with severe therapy-resistant asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2019;30(1):130-136.
17. ORGANIZATION WH. Who Growth reference data for 5-19 years, 2007. Updated 2014 aug 23. Available from: <http://www.who.int/growthref/en>. Accessed: march 2019.
18. Luisi F, Pinto LA, Marostica L, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM. Persistent pulmonary function impairment in children and adolescents with asthma. *J Bras Pneumol*. 2012;38(2):158-66.
19. Society AT, Society ER. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(8):912-30.
20. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J*. 2012;40(6):1324-43.
21. Gibson PG, Grootendor DC, Henry RL, Pin I, Ryttila PH, Wark P, et al. Sputum induction in children. *Eur Respir J Suppl*. 2002;37:44s-6s.
22. Bush A, Saglani S. Management of severe asthma in children. *Lancet*. 2010;376(9743):814-25.
23. Pitrez PM, de Souza RG. Impact of omalizumab in children from a middle-income country with severe therapy-resistant asthma: A real-life study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2017;52(11):1408-13.
24. Kuprys-Lipinska I, Molinska K, Kuna P. The effect of omalizumab on eosinophilic inflammation of the respiratory tract in patients with allergic asthma. *Pneumonol Alergol Pol*. 2016;84(4):232-43.

25. Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma. *Am J Respir Cell Mol Bio.* 2011;44(2):127-33.
26. Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, et al. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(2):505-11.

11 Anexo III

Nível de controle dos sintomas de asma (GINA 2014)

GINA	Nas 4 semanas anteriores o paciente teve:	Sim	Não
1	Sintomas diurnos >2x por semana		
2	Algum despertar noturno devido à asma		
3	Uso de medicação de resgate >2x por semana		
4	Alguma limitação de atividade física pela asma		

Legenda (Pontuação)	
Controlada	Nenhuma destas situações
Parcialmente controlada	1-2 situações
Não controlada	3-4 situações

12 Anexo IV

Termo de consentimento livre e esclarecido

Avaliação longitudinal do impacto e de características da asma grave resistente à terapia em crianças do sul do Brasil

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo chamado “Avaliação longitudinal do impacto e de características da asma grave resistente à terapia em crianças brasileiras”. A asma na infância é muito comum, e a forma grave da doença compromete de forma importante a qualidade de vida do paciente e sua família. No Brasil, se conhece muito pouco sobre asma grave na criança, e não foi realizado até o presente nenhum estudo para melhor entender a doença.

O objetivo deste documento é informar sobre o estudo para que você decida se quer ou não que seu(sua) filho(a) participe. Por favor, leia com atenção. Se você não entender algum conceito ou palavra, não deixe de perguntar para o membro da equipe do estudo, que lhe explicará o que for necessário. A participação neste estudo é voluntária, ou seja, seu filho(a) não precisa participar se não quiser. Ele(a) tem o direito de se retirar do estudo a qualquer momento.

Este estudo será conduzido por pesquisadores que atuam na área de doenças respiratórias pediátricas há mais de 15 anos. O projeto possui o objetivo de avaliar o impacto da doença (qualidade de vida e saúde mental), bem como as características da função pulmonar e inflamação dos pulmões, durante um período de seis meses de seguimento. O recrutamento e atendimento será realizado no Ambulatório de Pneumologia Pediátrica do HSL e no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, com a participação de aproximadamente 42 participantes, divididos em 2 grupos. O primeiro grupo será composto por pacientes com asma grave e o segundo grupo com ALM.

Abaixo, segue as descrições de todos os procedimentos que seu filho(a) irá realizar ao longo do seguimento do presente estudo.

PROTOCOLO DO ESTUDO

Avaliação de controle da doença: os participantes serão convidados a responder dois questionários curtos, compostos por quatro e cinco questões cada, para a avaliação do controle da doença, aplicados em todas as visitas do estudo.

Questionário de qualidade de vida: os participantes serão convidados a responder um questionário específico na primeira, terceira e sexta visita. Esse instrumento é constituído por 23 itens, abrangendo sintomas, limitações nas atividades e funções emocionais, com o objetivo de avaliar a qualidade de vida relacionada à asma.

Mensuração de óxido nítrico exalado: as crianças serão instruídas a realizar um sopro prolongado dentro de um equipamento portátil específico, para medir a inflamação das vias aéreas. Esse teste dura em torno de 5 minutos e será realizado em todas as visitas.

Espirometria: este exame consiste de uma inspiração profunda seguida de uma expiração rápida (encher o peito de ar e soprar com força) em um aparelho que mede função pulmonar. O teste será feito antes e após o uso de um broncodilatador (salbutamol), muito seguro e amplamente usado sem problemas em crianças com asma. Esse exame dura em torno de 30 minutos e será realizado no momento da inclusão, na primeira, terceira e sexta visita.

Escarro induzido: serão feitas nebulizações com soro salgado (mais ou menos como a água do mar) por um tempo de no máximo 20 minutos, para obtenção de secreção dos pulmões. O catarro coletado vai ser examinado para ver os diferentes tipos de inflamação. Esse procedimento será realizado somente na primeira e última visita do estudo.

Teste cutâneo: este teste consiste em aplicar uma série de substâncias que podem provocar alergia (gotas de extrato de alérgenos) na superfície anterior do antebraço, utilizando um conta-gotas. Após a aplicação dessas gotas será dado uma pequena “picada” na pele no

centro das gotas, com uma pequena lanceta. Essa lanceta é tem um dispositivo plástico que limita o grau de penetração na pele (picada muito superficial), para permitir o contato do alérgeno com a região abaixo da pele. A leitura será feita após 15 minutos. A presença de reação alérgica no local (parecida com picada de mosquito) será avaliada em cada gota de alérgeno. Essa avaliação será realizada somente numa vez no início do estudo.

RISCOS E INCONVENIENTES

Este estudo oferece pequenos riscos aos seus participantes. É possível que os exames de soprar, correr na esteira e inalar medicamentos possam dificultar a entrada e saída do ar, levando ao chiado no peito e a falta de ar. No entanto, todos esses procedimentos são considerados seguros e as complicações são consideradas raras de acordo com as recomendações clínicas desses exames, principalmente em crianças e adolescentes. Caso seja necessário, medidas de broncodilatação serão tomadas pela equipe médica do estudo, visando a recuperação do paciente. Além disso, os testes serão interrompidos a qualquer momento caso o paciente relate algum desconforto.

BENEFÍCIOS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO

Ao participar do nosso estudo você estará ajudando a melhorar os conhecimentos sobre a asma mais grave em crianças, trazendo benefícios para o tratamento e diagnóstico da doença. Além disso, você estará proporcionado ao seu filho uma avaliação completa e moderna da asma do seu(sua) filho(a) pela equipe médica do estudo.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo para os participantes do estudo, mas você e seu(sua) filho(a) também não receberão nenhum pagamento pela participação no trabalho, a não ser a cobertura dos custos de deslocamento, quando necessário.

CONFIDENCIALIDADE

As informações referentes à participação do seu(sua) filho(a) neste estudo são confidenciais e serão mantidas sob sigilo. Os dados pessoais do seu(sua) filho(a) (nome, número de identificação, telefone, endereço) não serão incluídos no banco de dados e a identidade dele(a) será mantida confidencial. Todas as legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros serão cumpridos neste estudo.

RESULTADOS DA PESQUISA

O seu médico informará a você o resultado dos procedimentos que seu filho(a) for submetido durante os seis meses de acompanhamento do estudo.

DÚVIDAS

PESSOA(S) DE CONTATO:

Se você tiver alguma dúvida, se tiver alguma lesão durante o estudo ou se apresentar algum efeito adverso durante o estudo, entre em contato com o pesquisador responsável, Dr^a. Bárbara Nery Porto no endereço Av. Ipiranga, 6690 – sala 31- Jardim Botânico. Porto Alegre/RS – CEP: 90610-000 e telefone +51 3320-3353 R:2313.

Se você tiver alguma dúvida sobre seus direitos como participante do estudo ou alguma questão ética, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul no endereço Av. Ipiranga 6681, Prédio 40 - Sala 505 - Paternon. Porto Alegre/RS - CEP: 90619-900, telefone +51 3320-3345 e e-mail cep@pucrs.br de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h30 às 17h30. Este é um grupo de pessoas da área científica e não científica que analisa estudos clínicos considerando a segurança e o bem-estar dos participantes do estudo, e que deu parecer favorável a este estudo clínico.

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

Li este documento e alguém explicou seu conteúdo para mim. Compreendi a finalidade deste estudo e o que acontecerá com meu(minha) filho(a) neste estudo. Concordo livremente que meu(minha) filho(a) participe deste estudo, conforme foi descrito para mim neste documento. Entendo que receberei uma via original assinada deste documento, e tanto eu como o investigador devemos rubricar todas as páginas. Ao assinar este termo não desisti de qualquer direito legal de meu filho(a).

Nome do sujeito de pesquisa

Data

Nome do representante legal

Data

Assinatura do membro da equipe

Data

11 Anexo V

Termo de assentimento

Avaliação longitudinal do impacto e de características da asma grave resistente à terapia em crianças do sul do Brasil

Você está sendo convidado para participar de um estudo sobre asma na criança. A asma é uma doença que atinge os pulmões, provocando sintomas, como falta de ar, chiado no peito, tosse, e cansaço. Um estudo é uma maneira de descobrir novas informações sobre a doença, que pode ser útil para desenvolver novos exames e tratamentos, trazendo melhorias na sua qualidade de vida. Se você não quiser, não precisa participar deste estudo. Os médicos ainda irão cuidar de você mesmo que não queira fazer parte deste estudo. Os médicos irão falar também com seus pais sobre o estudo. Você também deve falar com seus pais e seu médico sobre participar deste estudo.

Para participar deste estudo, você terá que realizar alguns exames. Por isso, você precisa informar o médico ou a equipe que trabalha com ele como você se sente antes e depois de realizar os exames. O médico ou sua equipe também compartilharão informações de registros médicos seus. O médico e membros da equipe lhe farão perguntas sobre a sua doença.

Se você aceitar participar do estudo, você deverá vir regularmente nas consultas pré-agendadas. Durante estas visitas, iremos realizar avaliações médicas, questionários e alguns exames para avaliar seus pulmões. Logo abaixo iremos explicar todos os procedimentos que você irá ser convidado a realizar.

Procedimentos propostos:

- Avaliação de controle da doença: você irá ser convidado a responder dois questionários curtos a cada visita. Estes questionários ajudarão os pesquisadores a entenderem melhor a gravidade e controle de sua asma.
- Mensuração de óxido nítrico exalado: você irá ser convidado a soprar em um pequeno equipamento específico para medir um gás exalado na respiração. Este exame serve para medir a inflamação do pulmão.
- Espirometria: neste exame você será instruído pelo membro de nossa equipe a realizar uma inspiração profunda, seguida de uma expiração rápida (encher o peito de ar e soprar com força), para medir a capacidade de seu pulmão.
- Escarro induzido: serão feitas 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 o catarro. Se você conseguir eliminar catarro, ele será analisado quanto ao tipo de inflamação.
- Teste cutâneo: este teste consiste em pingar uma gota de 10 substâncias que podem provocar alergia na superfície anterior do seu braço, utilizando um conta-gotas. Após a aplicação dessas gotas, será dado uma pequena “picada” (parecida com picada de mosquito) no centro das gotas, com uma pequena lanceta, para posterior leitura da resposta alérgica. Este exame vai dizer ao que você é alérgico no ambiente.

Rubrica do paciente

Rubrica do pesquisador

- Benefícios: ao participar do nosso estudo você pode auxiliar os pesquisadores a melhorar os conhecimentos sobre a asma, alergia, particularmente em relação ao controle da doença e melhoria da qualidade de vida, para melhor prevenção e cuidados da sua saúde respiratória.

Confidencialidade: os dados dos questionários e os resultados individuais dos exames são confidenciais e não poderão ser utilizados para outros objetivos que não estejam descritos

neste termo. Os resultados deste estudo deverão ser publicados, mas a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento.

Direito de cancelar a participação no estudo: esteja ciente de que em qualquer momento você pode cancelar sua participação no estudo.

Custos: não haverá custos para os participantes do estudo. Você também não receberá nenhum pagamento pela participação no trabalho.

Dúvidas: PESSOA(S) DE CONTATO:

Se você tiver alguma dúvida, se tiver alguma lesão durante o estudo ou se apresentar algum efeito adverso durante o estudo, entre em contato com o pesquisador responsável, Dr^a. Bárbara Nery Porto no endereço Av. Ipiranga, 6690 – sala 31- Jardim Botânico. Porto Alegre/RS – CEP: 90610-000 e telefone +51 3320-3353 R:2313.

Se você tiver alguma dúvida sobre seus direitos como participante do estudo ou alguma questão ética, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul no endereço Av. Ipiranga 6681, Prédio 40 - Sala 505 - Paternon. Porto Alegre/RS - CEP: 90619-900, telefone +51 3320-3345 e e-mail cep@pucrs.br de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h30 às 17h30. Este é um grupo de pessoas da área científica e não científica que analisa estudos clínicos considerando a segurança e o bem-estar dos participantes do estudo, e que deu parecer favorável a este estudo clínico.

Rubrica do paciente

Rubrica do pesquisador

Se você concorda em participar do presente estudo, por favor, preencha as informações abaixo:

Eu, _____, aceito participar da pesquisa acima. Declaro que os pesquisadores me explicaram todas as etapas e exames que farei neste estudo, bem como os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Compreendo que não sou obrigado a participar da pesquisa, decidindo quanto à participação ou não do estudo. Desta forma, concordo livremente em participar deste estudo, sabendo que posso desistir a qualquer momento, se assim desejar. Eu concordo em participar desta pesquisa, e aceito realizar as seguintes avaliações:

Questionários () Sim, estou de acordo () Não, não estou de acordo

Rubrica do escolar

Exame de espirometria () Sim, estou de acordo () Não, não estou de acordo

Rubrica do escolar

Escarro induzido () Sim, estou de acordo () Não, não estou de acordo

Rubrica do escolar

Avaliação do teste cutâneo () Sim, estou de acordo () Não, não estou de acordo

Rubrica do escolar

Porto Alegre, _____ de _____ de 201____.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

12 Anexo VI

Parecer consubstanciado do CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação longitudinal do perfil inflamatório das vias aéreas inferiores de crianças e adolescentes, com asma grave resistente à terapia, do sul do Brasil

Pesquisador: Bárbara Nery Porto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 91092218.1.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.826.711

Apresentação do Projeto:

A asma é um problema de saúde global, altamente prevalente na população infantil. Um subgrupo de crianças, cerca de 5-10% dos asmáticos, não responde adequadamente ao tratamento, com ausência de controle da doença, mesmo com a melhor otimização do manejo clínico, sendo então classificados como asma grave resistente à terapia (AGRT). Existem poucos estudos avaliando o impacto da doença em crianças com AGRT. Pretende-se neste estudo avaliar o perfil de inflamação das vias aéreas inferiores (escarro induzido) e as características da função pulmonar (espirometria) em um período de seguimento de seis meses, em crianças e adolescentes (6 a 18 anos, de ambos os sexos) com AGRT, comparando com crianças com asma leve a moderada.

Os pacientes serão classificados em AGRT ou asma leve a moderada, de acordo com critérios internacionalmente estabelecidos na literatura. Os pacientes, após inclusão no estudo, serão acompanhados por 6 meses, mensalmente, quando questionários de controle da doença, testes de função pulmonar e escarro induzido serão aplicados e realizados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar o perfil de inflamação das vias aéreas inferiores e as características da função pulmonar, em um período de seguimento de seis meses, em crianças e adolescentes com asma grave resistente à terapia, comparando com crianças e adolescentes com asma leve a moderada.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

Objetivos específicos

Serão avaliados os seguintes aspectos em crianças e adolescentes com asma grave resistente à terapia, comparando com crianças e adolescentes com asma leve a moderada:

Inflamação das vias aéreas inferiores, por meio de exame de escarro induzido;

Fluxos expiratórios e volumes pulmonares através da espirometria;

Correlacionar as medidas do teste de espirometria e as medidas de inflamação das vias aéreas inferiores

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Este estudo oferece pequenos riscos aos seus participantes. É possível que os exames de soprar, correr na esteira e inalar medicamentos possam dificultar a entrada e saída do ar, levando ao chiado no peito e a falta de ar. No entanto, todos esses procedimentos são considerados seguros e as complicações são consideradas raras de acordo com as recomendações clínicas desses exames, principalmente em crianças e adolescentes. Caso seja necessário, medidas de broncodilatação serão tomadas pela equipe médica do estudo, visando a recuperação do paciente. Além disso, os testes serão interrompidos a qualquer momento caso o paciente relate algum desconforto.

Benefícios: Ao participar do nosso estudo você estará ajudando a melhorar os conhecimentos sobre a asma mais grave em crianças, trazendo benefícios para o tratamento e diagnóstico da doença. Além disso, você estará proporcionado ao seu filho uma avaliação completa e moderna da asma do seu(sua)filho(a) pela equipe médica do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de relevância, uma vez que a asma é um problema de saúde global, altamente prevalente na população infantil. Um subgrupo de crianças, cerca de 5-10% dos asmáticos, não responde adequadamente ao tratamento, com ausência de controle da doença, mesmo com a melhor otimização do manejo clínico, sendo então classificados como asma grave resistente à terapia (AGRT). Existem poucos estudos avaliando o impacto da doença em crianças com AGRT.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todos os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP: Diante do exposto, o CEP-PUCRS, de acordo com as suas atribuições definidas na Resolução CNS n° 466 de 2012 e a Norma Operacional n° 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1143899.pdf	09/08/2018 14:40:18		Aceito
Outros	carta_Resposta_Pendencias.doc	09/08/2018 14:39:13	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP.pdf	06/08/2018 16:06:23	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_marcado1.pdf	06/08/2018 16:05:53	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_marcado1.docx	06/08/2018 16:05:40	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_limpo1.pdf	06/08/2018 16:05:29	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_limpo1.docx	06/08/2018 16:05:05	Bárbara Nery Porto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_FINAL.pdf	06/08/2018 16:04:46	Bárbara Nery Porto	Aceito

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Brochura Pesquisa	Projeto_BarbaraFINAL.docx	06/08/2018 16:03:32	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Carta_chefe_servico.pdf	25/07/2018 16:41:25	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Formulario_CPC.pdf	25/07/2018 16:40:53	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Carta_Orcamento_CPC.pdf	25/07/2018 16:40:02	Bárbara Nery Porto	Aceito
Orçamento	Orcamento_CPC.pdf	25/07/2018 16:39:35	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_marcado.pdf	25/07/2018 16:38:21	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_marcado.docx	25/07/2018 16:38:01	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_limpo.pdf	25/07/2018 16:37:47	Bárbara Nery Porto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_limpo.docx	25/07/2018 16:37:32	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Documento_Unificado_SIPESQ.pdf	01/06/2018 14:49:55	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	cvlattes_equipe.docx	24/05/2018 16:25:08	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Declaracao_PauloPitrez.pdf	24/05/2018 16:17:41	Bárbara Nery Porto	Aceito
Outros	Carta_apresentacao_CC_CEP.pdf	24/05/2018 16:14:21	Bárbara Nery Porto	Aceito
Parecer Anterior	PARECERDEAPROVACAODOPROJET OGUARDACHUVA.pdf	24/05/2018 16:10:38	Bárbara Nery Porto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	24/05/2018 16:03:34	Bárbara Nery Porto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puccrs.br

PORTO ALEGRE, 16 de Agosto de 2018

Assinado por:
Paulo Vinicius Sporleder de Souza
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

13 Referências

1. GINA. Global Initiative for Asthma. 2019 GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2019 [cited 2019 14 de maio]. Available from: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/04/GINA-2019-main-Pocket-Guide-wms.pdf>.
2. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008;31(1):143-78.
3. Lang A, Carlsen KH, Haaland G, Devulapalli CS, Munthe-Kaas M, Mowinckel P, et al. Severe asthma in childhood: assessed in 10 year olds in a birth cohort study. *Allergy*. 2008;63(8):1054-60.
4. Simões SM, Cunha SS, Barreto ML, Cruz AA. Distribution of severity of asthma in childhood. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(5):417-23.
5. Godard P, Chanez P, Siraudin L, Nicoloyannis N, Duru G. Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study. *Eur Respir J*. 2002;19(1):61-7.
6. Society AT, Society ER. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(8):912-30.
7. Bush A, Hedlin G, Carlsen KH, de Benedictis F, Lodrup-Carlsen K, Wilson N. Severe childhood asthma: a common international approach? *Lancet (London, England)*. 2008;372(9643):1019-21.
8. Lødrup Carlsen KC, Hedlin G, Bush A, Wennergren G, de Benedictis FM, De Jongste JC, et al. Assessment of problematic severe asthma in children. *Eur Respir J*. 2011;37(2):432-40.
9. Chung KF, Wenzel SE, Boulet L-P, Brightling C, Chanez P, Dahlen S-E, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;43:343-73.

10. Asher I, Pearce N. Global burden of asthma among children. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2014;18(11):1269-78.
11. Matsunaga NY, Ribeiro MAGdO, Saad IAB, Morcillo AM, Ribeiro JD, Toro AADC. Evaluation of quality of life according to asthma control and asthma severity in children and adolescents. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2015;41(6):502-8.
12. Chipps BE, Szeffler SJ, Simons FER, Haselkorn T, Mink DR, Deniz Y, et al. Demographic and clinical characteristics of children and adolescents with severe or difficult-to-treat asthma. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(5):1156-63.
13. Rodrigues AM. Características clínicas e fenotípicas de asma grave resistente à terapia em crianças brasileiras. *J Bras Pneumol*. 2015;41:343-50.
14. de Blic J, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Jaubert F, Scheinmann P, Gosset P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(1):94-100.
15. Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, et al. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(9):858-64.
16. Gibson PG, Grootendor DC, Henry RL, Pin I, Rytala PH, Wark P, et al. Sputum induction in children. *Eur Respir J Suppl*. 2002;37:44s-6s.
17. Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Wilson NM, Hansel TT, et al. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol*. 2005;39(4):318-24.
18. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax*. 2012;67(8):675-81.
19. Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK, Brasileiro I-G. Prevalência de sintomas de asma, rinite e eczema atópico entre crianças e adolescentes brasileiros

identificados pelo International Study of Asthma and Allergies (ISAAC)-Fase 3. *Jornal de pediatria*. 2006;82(5).

20. Maslan J, Mims JW. What is asthma? Pathophysiology, demographics, and health care costs. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2014;47(1):13-22.

21. Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH, et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(8):4668-75.

22. Kroegel C. Global Initiative for Asthma (GINA) guidelines: 15 years of application. *Expert review of clinical immunology*. 2009;5(3):239-49.

23. Sheffer AL, Taggart VS. The National Asthma Education Program. Expert panel report guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute. *Medical care*. 1993;31(3 Suppl):Ms20-8.

24. Pizzichini E, Pizzichini M, Kidney J, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J*. 1998;11(4):828-34.

25. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2006;11(1):54-61.

26. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J*. 2012;40(6):1324-43.

27. Stirbulov R, Bernd LAG, Sole D. IV Diretrizes brasileiras para o manejo da asma. 2006.

28. Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet LP, Cruz AA, Drazen JM, et al. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J*. 2015;46(3):622-39.

29. Jia CE, Zhang HP, Lv Y, Liang R, Jiang YQ, Powell H, et al. The Asthma Control Test and Asthma Control Questionnaire for assessing asthma control: Systematic review and meta-analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(3):695-703.

30. Kuprys-Lipinska I, Kuna P. [Changes in the newest recommendations on Asthma Management and Prevention - GINA Report 2014. What should we pay attention to?]. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2014;82(5):393-401.
31. Oliveira SG. Validação do questionário Childhood Asthma Control Test (c-ACT) para o Brasil. 2015.
32. Luisi F, Pinto LA, Marostica L, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM. Persistent pulmonary function impairment in children and adolescents with asthma. *J Bras Pneumol*. 2012;38(2):158-66.
33. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, et al. General considerations for lung function testing. *Eur Respir J*. 2005;26(1):153-61.
34. ORGANIZATION WH. Who Growth reference data for 5-19 years, 2007.[internet] 2014 [updated 2014 aug23]. Available from: Disponível em <http://www.who.int/growthref/en>.
35. Pitrez PM, de Souza RG. Impact of omalizumab in children from a middle-income country with severe therapy-resistant asthma: A real-life study. 2017;52(11):1408-13.
36. Kuprys-Lipinska I, Molinska K, Kuna P. The effect of omalizumab on eosinophilic inflammation of the respiratory tract in patients with allergic asthma. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2016;84(4):232-43.
37. Dudvarski Ilic A, Zugic V, Zvezdin B, Kopitovic I, Cekerevac I, Cupurdija V, et al. Influence of inhaler technique on asthma and COPD control: a multicenter experience. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2016;11:2509-17.
38. Yalcin AD, Celik B, Yalcin AN. Omalizumab (anti-IgE) therapy in the asthma-COPD overlap syndrome (ACOS) and its effects on circulating cytokine levels. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2016;38(3):253-6.
39. Tabatabaian F, Ledford DK. Omalizumab for severe asthma: toward personalized treatment based on biomarker profile and clinical history. *Journal of asthma and allergy*. 2018;11:53.

40. de Jesus JPV, Lima-Matos AS, Almeida PCA, Lima VB, de Mello LM, Souza-Machado A, et al. Obesidade e asma: caracterização clínica e laboratorial de uma associação frequente. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2018;44(3):207-12.
41. Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;44(2):127-33.
42. Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, et al. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):505-11.