

ORLEI KANTOR JUNIOR

**PAPEL DOS EOSINÓFILOS NA REAÇÃO ALÉRGICA
MEDIADA PELA IgE, NA ASMA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Grau de Mestre no Curso de
Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Nelson A. Rosário Filho

**CURITIBA
1994**

ORLEI KANTOR JUNIOR

**PAPEL DOS EOSINÓFILOS NA REAÇÃO ALÉRGICA
MEDIADA PELA IgE, NA ASMA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Pediatria - Mestrado, do Departamento de Pediatria, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: **Prof. Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho**
 Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Roberto Pirajá Moritz de Araújo
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Dirceu Solé
Escola Paulista de Medicina

Curitiba, 15 de junho de 1994

Dedico este trabalho:

aos meus pais, Maria do Carmo e Orlei ("in memoriam");

*à minha esposa, Wanja,
pelo apoio e serenidade nas horas difíceis;*

*aos meus filhos, Netto e Marcelle ,
razão das nossas vidas.*

AGRADECIMENTOS

O autor agradece às pessoas e Instituições que colaboraram na formulação dessa Dissertação:

- Prof. Nelson Augusto Rosário Filho. Prof. adjunto do Departamento de Pediatria - U.F.PR. e orientador deste trabalho.
- Prof. Mitsuru Miyaki. Chefe do Departamento de Pediatria do Hospital de Clínicas - U.F.PR.
- Prof. Izrail Cat. Chefe Geral da UTI Pediátrica. Departamento de Pediatria - Hospital de Clínicas - U.F.PR.
- Prof. Dinarte José Giraldi, Prof. Dr. Noboro Miasaki, Prof. Antônio Franco e funcionários do Laboratório. Departamento de Pediatria - U.F.PR.
- Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas (S.A.C.) nas Sessões de Imunogenética, Bioquímica, Hematologia e Parasitologia.
- Bioq. Alda Rosa Dorigo e funcionários. Central de Soluções do Hospital de Clínicas - U.F.P.R.
- Professores, médicos, mestrandos, acadêmicos e funcionários do Departamento de Pediatria - U.F.PR.
- Prof. Gilberto Antunes Sampaio. Prof. assistente do Departamento de Patologia Médica do Hospital de Clínicas - U.F.PR.

- Prof^a. Dr^a. Iara J. T. de Messias. Prof^a. adjunta do Departamento de Patologia Médica do Hospital de Clínicas - U.F.PR.
- Prof. Luis Carlos Wollner, Prof. Renato José Ramos e Bioq. Vivian Mara Cortes Camargo. Serviço de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas - U.F.PR.
- Prof. Dr. Ney Camargo Neto. Departamento de Patologia Básica. Setor de Ciências Biológicas - U.F.PR.
- Prof. Dra. Dorly de Freitas Buchi, alunas Juliana Quadros e Cristiane Marcantonio Jassini. Departamento de Biologia Celular - U.F.PR.
- Prof. Roberto Pirajá Moritz de Araújo. Prof. adjunto do Departamento de Clínica Médica do Hospital de Clínicas - U.F.PR.
- Biblioteca do Setor de Ciências de Saúde - U.F.PR.
- Prof. Dr. Luiz Gonzaga Caleffe e Sr. Marcos Arbos. Departamento de Estatística -U.F.PR.
- Prof. Dr. José Sebastião Cunha Fernandes e Prof. Dr. Juarez Gabardo. Departamento de Genética - U.F.PR.
- Prof. Dr. Walter Krüger. Dep. de Química Orgânica - U.F.PR.
- Bioq. Maria Luíza Marques Halila. Divisão de Química Orgânica do TECPAR.
- Prof. Márcia Ianoski. Secretaria de Esportes e Turismo do Estado do Paraná.
- Pharmacia Biotech do Brasil Ltda.
- Laboratório Weimann Ltda.
- Laboratório Fleury Ltda.
- Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

- Conselho Regional de Medicina do Paraná (CRM).

O autor também agradece às pessoas e Instituições estrangeiras que colaboraram na formulação dessa Dissertação:

- Prof. Dr. Nicolas Cobos Barroso e Prof. Dr. Santos Liñan Cortés. Universidade Autônoma de Barcelona - Espanha.

- Prof. Dra. Julie Sedgwick e Prof. Dr. Willian Busse. Universidade de Wiscosin, Madison - U.S.A.

- Prof. Dr. Frans H. Krouwels e colaboradores. Hospital Sophia, Universidade de Roterdan - Holanda.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
1 ATOPIA	12
2 INFECÇÃO	12
3 FATOR GENÉTICO	13
OBJETIVOS	17
CASUÍSTICA	19
1. POPULAÇÃO ESTUDADA	20
1.1 PACIENTES	20
1.2 CONTROLES	20
2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	21
3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
1 MATERIAIS	24
2 MÉTODOS	27
2.1 ANAMNESE E TESTE CUTÂNEO DE LEITURA IMEDIATA	27
2.2 PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR	27
2.3 PROVOCAÇÃO BRÔNQUICA	27

2.4 PARASITOLÓGICO DE FEZES	28
2.5 COLETA DE SANGUE E HEMOGRAMA	29
2.6 FRACIONAMENTO DE EOSINÓFILOS PELA DENSIDADE	29
2.6.1 Suspensão de granulócitos	29
2.6.2 Preparação do Percoll	30
2.6.3 Autogeração dos gradientes de Percoll	31
2.7 DOSAGEM DE IgE TOTAL	32
2.8 DOSAGEM DE IgE ESPECÍFICA	33
2.9 PROTEÍNA CATIÔNICA EOSINOFÍLICA (ECP)	33
2.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA	34
2.11 MÉTODOS ESTATÍSTICOS	34
RESULTADOS	36
1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS.....	37
2 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	38
3 PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR	38
4 CONTAGENS CELULARES NO SANGUE.....	40
5 NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA CATIÔNICA EOSINOFÍLICA (ECP)	44
6 IgE TOTAL E ESPECÍFICA	46
7 CORRELAÇÕES.....	49
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	82

LISTA DE TABELAS

TABELA I - AUTOGERAÇÃO DE GRADIENTES DE CÉLULAS POR MEIO DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO E USO DA TÉCNICA DO PERCOLL.....	31
TABELA II - CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DA CASUÍSTICA AVALIADA.....	37
TABELA III - RESULTADOS DAS PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR POR MEIO DA CVF, VEF ₁ E PFE.....	39
TABELA IV - FREQUÊNCIA DA HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA (HRB) NOS GRUPOS ESTUDADOS	40
TABELA V - NÚMERO DE LEUCÓCITOS, CONTAGEM DIFERENCIAL DE EOSINÓFILOS E BASÓFILOS E PERCENTUAL DE EOSINÓFILOS HIPODENSOS NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	41
TABELA VI - NÍVEIS SÉRICOS DE IgE TOTAL E ESPECÍFICA PARA <i>D. pteronyssinus</i> NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	48
TABELA VII - ASSOCIAÇÃO ENTRE "NÍVEIS EXTREMAMENTE ELEVADOS" DE IgE ESPECÍFICA E GRAVIDADE DA ASMA.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS EOSINÓFILOS HIPODENSOS NOS INDIVÍDUOS NORMAIS E ASMÁTICOS.....	43
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE PROTEÍNA CATIONICA EOSINOFÍLICA (ECP) EM NORMAIS E ASMÁTICOS.....	45
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS NÍVEIS DE IgE TOTAL NOS INDIVÍDUOS NORMAIS E ASMÁTICOS.....	47
FIGURA 4 - COMPARAÇÃO POR MEIO DE M.E. ENTRE EOSINÓFILOS NORMODENSOS E HIPODENSOS:	
A - EOSINÓFILO HIPODENSO	50
B - EOSINÓFILO NORMODENSO	51

LISTA DE ABREVIATURAS

CVF: Capacidade vital forçada.

VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo.

PFE: Pico de fluxo expiratório.

DP₂₀: Dose de provocação por metacolina capaz de reduzir em 20% o VEF₁.

HRB: Hiperreatividade brônquica.

ECP: Proteína catiônica eosinofílica.

MBP: Proteína alcalina principal.

EPX: Proteína X do eosinófilo.

EDN: Neurotoxina derivada do eosinófilo.

EH: Eosinófilo hipodenso.

IgE: Imunoglobulina E.

EOS: Eosinófilo.

RESUMO

Foram estudadas 43 crianças e adolescentes asmáticos subdivididos em dois grupos segundo a gravidade da doença com base nos critérios de Aas e comparadas a um grupo de 18 indivíduos normais. A avaliação foi realizada por meio de anamnese alergológica; testes cutâneos de leitura imediata ao extrato alergênico de *D. pteronyssinus*; provas de função pulmonar; provocação brônquica à metacolina; porcentagens de eosinófilos, basófilos e eosinófilos hipodensos em sangue periférico; dosagem de IgE total; IgE específica e proteína catiônica eosinofílica no soro. Verificou-se aumento da porcentagem de eosinófilos hipodensos nos pacientes asmáticos em relação aos indivíduos normais. Houve correlação entre os eosinófilos hipodensos, os eosinófilos periféricos e a proteína catiônica eosinofílica, demonstrando haver relação entre eosinofilia, ativação do eosinófilo e liberação do mediador. Demonstramos haver correlação entre IgE total e a específica ao *D. pteronyssinus* e com a hiperreatividade Brônquica (DP₂₀), isto é, uma relação positiva entre o grau de alergia e de hiperreatividade à metacolina. Em conclusão, o eosinófilo por meio de sua forma ativada de baixa densidade e de seus mediadores químicos, está relacionado à gravidade da asma e à hiperreatividade nas vias aéreas.

ABSTRACT

We studied 43 children and adolescents with bronchial asthma in two groups according to the classification of asthma severity by Aas. A control group of 18 non-atopic children was also included. They were all evaluated by a thorough clinical evaluation for atopy through total and specific serum IgE and immediate allergy skin tests; pulmonary function testing; bronchial hyperreactivity to methacholine; peripheral blood basophils and eosinophils; hypodense eosinophils and eosinophilic cationic protein. Asthmatics had an increase in blood basophils and eosinophils, but also in hypodense eosinophils. An increase in ECP was observed in asthmatics and correlated significantly to eosinophilia and low density eosinophils. Bronchial hyperreactivity was correlated to total IgE and to eosinophilia. In summary, eosinophils through its activated low density variant in addition to its chemical mediators are related to severity of asthma, and probably to airway inflammation.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As manifestações alérgicas representam um fator de morbidade na população em geral, das quais, a asma é considerada a mais importante. A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas na qual muitas células, como linfócitos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos têm participação ativa. Nos indivíduos susceptíveis, esta inflamação causa sintomas que estão usualmente associados à obstrução de graus variados ao fluxo aéreo e que pode ser reversível espontaneamente ou por tratamento. Causa também, aumento da resposta a vários outros estímulos nas vias aéreas (WELLER, 1984; GLEICH, 1990).

A provocação brônquica com alérgeno específico, nos forneceu a compreensão de alguns fenômenos fisiopatológicos na asma (CHAI, 1988). Há uma resposta imediata que ocorre aproximadamente após trinta minutos, que se caracteriza pelo predomínio de broncoespasmo, resultante da ação de mediadores químicos. Uma resposta tardia, que ocorre, entre quatro e seis horas após a broncoprovocação, caracterizada pelo predomínio de inflamação, sendo mais intensa e prolongada que a resposta imediata (FRIGAS e GLEICH, 1986).

Os eosinófilos são capazes de liberar mediadores (proteína catiônica eosinofílica, proteína alcalina principal, peroxidase eosinofílica, etc.) e mediadores lipídicos (leucotrienos, fator ativador plaquetário, etc.) considerados relevantes na patogenia da asma (HUBSCHER, 1975a, b; HENDERSON et al., 1980; LEE et al. 1984; BRUIJNZEEL e VERHAGEN, 1989).

Na fase tardia, encontramos maciça infiltração de eosinófilos no parênquima

pulmonar. Entre quinhentos mil a um bilhão de eosinófilos promovem intensa destruição da mucosa brônquica devido à liberação de mediadores. Entretanto, os eosinófilos podem também liberar histaminase, arilsulfatase e fosfolipase que inativam histamina, leucotrienos e fator ativador plaquetário liberado pelos mastócitos. Com estas observações demonstrou-se que existem interações entre eosinófilos e outros sistemas que podem promover tanto lesão quanto proteção das estruturas pulmonares (FRIGAS e GLEICH, 1986).

Na década de 70, houve a confirmação de que a eosinofilia era um fenômeno dependente dos linfócitos T e a sugestão de que havia um fator de crescimento eosinopoiético originado destes linfócitos (BASTEN e BEESON, 1970). Outros autores, observaram nas células sangüíneas da medula óssea, a presença do fator de crescimento hematopoiético originalmente chamado de Fator estimulante de colônias (CSF-S) (VADAS et al., 1989).

Atualmente, são conhecidos três fatores responsáveis pela maturação e proliferação dos eosinófilos: a interleucina 3 (IL-3), a interleucina 5 (IL-5) e o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF).

Existe uma aparente redundância neste sistema, pois necessita três fatores diferentes para a maturação e proliferação dos eosinófilos. Na realidade o que existe é a interação de fatores, pois as células da medula óssea humana pré-incubadas com IL-3 aumentam a resposta eosinopoiética para a IL-5, assim como, em primatas a IL-3 potencializa o GM-CSF. Todos estes fatores são produzidos pelos linfócitos T (MANIATIS et al., 1987; WARREN e MOORE, 1988; FREW e KAY, 1990).

O método de contagem total de eosinófilos em sangue periférico foi um auxiliar na avaliação de pacientes asmáticos (LOWELL, 1967).

HONSINGER et al. (1972) observaram que havia melhora da função pulmonar quando ocorria decréscimo da contagem de eosinófilos em sangue periférico.

FRANKLIN (1974) sugeriu a utilidade da contagem destas células na asma grave e HORN et al. (1975) estudando pacientes asmáticos esteróide dependentes, observaram

que os sintomas eram melhor controlados quando a contagem destas células era inferior a $85/\text{mm}^3$. Havia maior sintomatologia quando as contagens estavam entre 100 e $250/\text{mm}^3$. No grupo controle todos os indivíduos tinham contagens inferiores a $350/\text{mm}^3$. Estabeleceram também a relação inversa entre o número de eosinófilos e o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1).

Em cobaias e humanos, foi demonstrada correlação entre eosinofilia e diminuição da função pulmonar. A eosinofilia aumentava também a resposta à metacolina (DURHAM e KAY., 1985; WEGNER et al., 1987; GRIFFIN et al., 1991).

MONCHY et al. (1985) estudaram a reação tardia na asma, por meio do lavado broncoalveolar e observaram que havia aumento significativo do número de eosinófilos pulmonares nos pacientes asmáticos em relação aos indivíduos normais.

Este estudo foi complementado com a observação de que havia diminuição relativa da eosinofilia periférica nas primeiras horas após a broncoprovocação. Este fato foi atribuído ao recrutamento dos eosinófilos para os pulmões e este recrutamento, definiria a presença ou não da resposta tardia. Neste trabalho, as contagens dos eosinófilos em sangue foram realizadas nos tempos 0, 9, 24 e 45 horas após a broncoprovocação com alérgeno (COOCKSON et al., 1989).

A contagem de eosinófilos em sangue periférico pode ser realizada por meio de hemograma ou pela técnica para contagem absoluta onde se usa solução contendo eosina, acetona e água e a contagem se procede na câmara de Fuchs - Rosenthal (DACIE e LEWIS., 1975).

ROSÁRIO FILHO (1980, 1988a) testou a reprodutibilidade destes métodos, não encontrando variações significativas. Observou também em estudo com 103 pacientes pediátricos com enteroparasitoses que a técnica para contagem absoluta é mais demorada, mais laboriosa e oferecia as mesmas informações que a leucometria diferencial no hemograma.

Os eosinófilos são considerados os principais responsáveis pelas lesões inflamatórias que ocorrem na asma (FRIGAS e GLEICH, 1986; ZIMMERMAN et al., 1988;

VENGE e HAKANSSON, 1991; VENGE, 1993a). A liberação dos grânulos de proteínas de pH fortemente básico demonstraram serem citotóxicas às células do epitélio respiratório.

Estas proteínas de diferentes pesos moleculares, foram assim identificadas:

- a) Proteína alcalina principal (MBP);
- b) Proteína catiônica eosinofílica (ECP);
- c) Neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN);
- d) Peroxidase eosinofílica (EPO);
- e) Proteína X do eosinófilo (EPX).

Vários autores estabeleceram que as proteínas alcalinas eram tóxicas ao epitélio respiratório de cobaias e humanos (GLEICH et al., 1973, 1976, 1979; FRIGAS et al., 1980, 1981). Outros estudaram a relação entre a atividade dos eosinófilos e a hiperreatividade brônquica (HRB) em asmáticos (VENGE et al., 1988; VENGE e HAKANSSON, 1991). Encontraram níveis séricos elevados de proteína catiônica eosinofílica e da proteína X do eosinófilo em pacientes que desenvolviam a reação tardia, quando submetidos à broncoprovocação. Demonstraram também que nos pacientes com asma induzida por exercício (AIE) havia elevação dos níveis de proteína catiônica eosinofílica.

DURHAN et al. (1989) estudando doze pacientes asmáticos e 23 indivíduos normais observaram, em sangue periférico, eosinofilia e aumento das proteínas alcalinas (ECP, MBP e EDN) quando submetidos à broncoprovocação com metacolina. Entretanto neste estudo, a peroxidase eosinofílica (EPO) não sofreu elevação significativa, fato atribuído possivelmente ao seu metabolismo ou recrutamento para áreas pulmonares.

A proteína alcalina principal (MBP) apresenta estruturas cristalóides dentro dos grânulos citoplasmáticos, na concentração estimada em $5 \text{ mcg}/10^6$ células. Ela pode ser encontrada também nos basófilos em pequenas concentrações. Foi encontrada no escarro em concentrações de 8 a 93 mcg/ml e a melhoria dos parâmetros da função respiratória estava relacionada à diminuição da sua concentração. Autópsias realizadas em pacientes, vitimados pela asma, mostraram por meio de estudos de anatomia

patológica e imunofluorescência, que havia depósitos desta proteína, predominantemente nos locais de lesões epiteliais (GLEICH, 1990).

A proteína alcalina principal tem peso molecular de 13.810 daltons e pH 10,9. Na seqüência dos aminoácidos de sua molécula, observou-se dezessete radicais arginina, que lhe conferem um caráter extremamente básico, nove radicais cisteína e quatro radicais sulfidrílicos, que explicam a forte propensão à agregação, inclusive com outras proteínas de pH alcalino. Existem numerosos radicais glicina e alanina. A análise do ácido desoxirribonucléico (ADN) mostrou que a proteína alcalina principal é produzida de uma pré-proteína enriquecida por ácido glutâmico que tem pH 3,9 e isto sugere que, ela é derivada de uma proteína precursora não-tóxica (FRIGAS et al., 1981, 1986; ACKERMAN et al., 1983; BARKER et al., 1988).

MOTOJIMA et al. (1989) estudaram a MBP e seus efeitos citotóxicos em traquéia de cobaias, observando que quando esta proteína estava em sua forma natural, com todos os seus radicais sulfidrílicos, necessitava concentrações de 10 mcg/ml, para promover lesões no epitélio respiratório. Quando eram eliminados estes radicais havia necessidade de concentrações maiores que 50 mcg/ml, para promover as mesmas lesões. Concentrações maiores que 100 mcg/ml, promovem diminuição de atividade ciliar e da enzima ATPase em traquéia de coelhos (HASTIE et al., 1987).

A proteína catiônica eosinofílica (ECP) foi isolada pela primeira vez em células sanguíneas de pacientes com leucemia mielóide (OLSSON e VENGE, 1974). Os autores demonstraram também que em indivíduos normais, a concentração era de 26 mcg/ 10^6 células. A secreção nasal de pacientes com rinite alérgica, submetidos à provocação, continha concentrações que variavam de 6 a 600 mcg/l, sendo a concentração basal média de 400 mcg/l (BISGAARD et al., 1990).

No lavado broncoalveolar, após broncoprovocação em asmáticos, os níveis máximos desta proteína foram de 130 mcg/l, enquanto que em pacientes adultos, com síndrome da angústia respiratória, atingiram níveis de 300 mcg/l. No sangue periférico de pacientes, com eosinofilia, podemos encontrar concentrações que variam de 200 a

20.000 mcg/l, enquanto que em indivíduos normais estas concentrações variavam de 5 a 55 mcg/l (GLEICH, 1990).

A proteína catiônica eosinofílica (ECP) possui peso molecular de aproximadamente 22.000 daltons, pH 11 e apresenta diferenças, entre indivíduos normais e com hipereosinofilia. Pode produzir lesões do epitélio respiratório, alterar a cascata da coagulação sanguínea e produzir o fenômeno Gordon (FREDENS et al., 1982; GLEICH et al., 1988; VENGE e PETERSON, 1989; VENGE, 1993a). O fenômeno Gordon se constitui em uma síndrome neurológica que apresenta ataxia, paralisia, incoordenação motora com lesões encefálicas graves em coelhos que recebiam injeções intratecais contendo lisados de linfonodos intestinais de pacientes com doença de Hodgkin. Descobriu-se que estes lisados só faziam a síndrome se apresentassem mais de 2.000 eosinófilos/mm³.

LUNDGREN et al. (1991) estudando a proteína catiônica eosinofílica e outras proteínas alcalinas observaram, tanto em felinos como em humanos, que estas poderiam alterar a concentração das secreções brônquicas. A elevação das concentrações destas proteínas, aumentava os glicoconjugados e a lactoferrina, esta última específica das glândulas serosas brônquicas. Elas alteravam a concentração e a quantidade das secreções brônquicas, além de promoverem, citotoxicidade e diminuição da mobilidade ciliar, que contribuem para aumentar as lesões epiteliais destes pacientes.

Em estudo com 43 pacientes adultos com asma e 10 voluntários sadios com contagens de eosinófilos no sangue e no lavado broncoalveolar; biópsias brônquicas e as concentrações da ECP, foi observado que na reação tardia dos asmáticos, havia aumento dos eosinófilos no sangue e no lavado, sendo que no lavado broncoalveolar, houve aumento entre 2,0±3,0% de eosinófilos em pacientes asmáticos, e de 0,1±0,3% em indivíduos normais. A dosagem concomitante da proteína catiônica eosinofílica no lavado, mostrou níveis de 1 a 400 ng/ml, nos asmáticos e de 1 a 2 ng/ml, em indivíduos normais (BOUSQUET et al., 1990a).

É possível avaliar a atividade inflamatória na asma por meio de células e seus marcadores, com quantificação de eosinófilos, eosinófilos hipodensos e das proteínas alcalinas. A histamina dos basófilos; a triptase e a quinase dos mastócitos e a mieloperoxidase dos neutrófilos também podem ser úteis nesta avaliação (MATSSON et al., 1990).

Diferenças morfológicas, metabólicas e funcionais, foram detectadas nos eosinófilos de indivíduos com eosinofilia (BASS et al., 1980). Foram encontradas, segundo o padrão de densidade, populações heterogêneas de eosinófilos, uma com densidade inferior a 1.084 g/ml, denominados de eosinófilos hipodensos ou "ativados" e outra com densidade superior a 1.084 g/ml, denominada de eosinófilos normodensos.

A solução de Ficoll com diatrizoato de sódio (Ficoll-Hypaque), separa hemácias, linfócitos e neutrófilos, por densidades específicas (BOYUM, 1968). Os eosinófilos permanecem na mesma faixa de densidade dos neutrófilos, que por sua vez, também apresentam alterações de densidade quando estimulados com NCF ou IL-8 (PEMBER et al., 1983; KAUFFMAN et al., 1991).

VADAS et al. (1979) demonstraram as diferenças de densidades dos eosinófilos usando a técnica com metrizamida, enquanto GARTNER (1980) utilizou a técnica de sedimentação com polivinilpirrolidona e gel de sílica (Percoll).

Outros autores (DE SIMONE et al., 1982; WINQVIST et al., 1982; PRIN et al., 1983; SHULT et al., 1985) comprovaram a eficiência do método. Em pacientes com doenças associadas à eosinofilia (parasitoses, tumores, etc.) observou-se um aumento do número e porcentagem de eosinófilos hipodensos. Quando estes apresentam hipereosinofilia, mais de 90% dos eosinófilos são hipodensos.

Em asmáticos foram encontrados entre 35 e 76% de eosinófilos hipodensos no sangue periférico (SHULT et al., 1985, 1988; FUKUDA et al., 1985; FUKUDA e MAKINO, 1989; KLOPROGGE et al., 1989) e em pacientes com rinite alérgica, encontraram 30% de eosinófilos hipodensos em sangue enquanto no grupo controle havia porcentagens inferiores a 10% (FRICK et al., 1988).

Os eosinófilos hipodensos aparecem em maiores quantidades nos órgãos e tecidos afetados. Por exemplo, no líquido pleural de pacientes com várias doenças pulmonares, de 80 a 100% dos eosinófilos eram hipodensos e no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos, 60% eram hipodensos (FUKUDA e MAKINO, 1989). Eles possuem propriedades ligadas à sua ativação. Bioquimicamente são capazes de aumentar o transporte de hexose transmembrana quando estimulados por zimosan ou cálcio e aumentar o metabolismo do oxigênio. Podem produzir três vezes mais fator ativador plaquetário que os eosinófilos normodensos. Exibem número maior de receptores de superfície para IgG (Fc IgG), IgE (Fc IgE) e C₃b. A liberação das proteínas alcalinas e do leucotrieno C₄ estão restritas aos hipodensos (WINQVIST et al., 1982). Morfologicamente observou-se vacuolização do citoplasma e degranulação parcial nos eosinófilos hipodensos. Estudos por microscopia eletrônica e programas computadorizados, demonstraram que não havia diferenças significativas no número de grânulos citoplasmáticos mas estes apresentavam uma área menor, o que poderia explicar sua baixa densidade (CAPRON et al., 1984, 1986; KHALIFE et al., 1985; FUKUDA e MAKINO, 1989; FUKUDA e GLEICH, 1989).

Os eosinófilos hipodensos foram estudados no sangue periférico, durante o início da fase tardia da asma, em 17 pacientes submetidos à broncoprovocação com alérgeno. Todos desenvolveram a fase imediata (100%) e 11 também a fase tardia (64%). No grupo sem a resposta dupla, a média de eosinófilos foi de 67,5%, e no grupo com resposta dupla 53,3%. Este valor menor, poderia ser explicado pelo recrutamento de eosinófilos hipodensos ao parênquima pulmonar (FRICK et al., 1989).

A atração dos eosinófilos para as vias aéreas é estimulada por substâncias liberadas de macrófagos, mastócitos e linfócitos e foi observada "in vivo" após broncoprovocação com antígeno (HOLGATE e KAY, 1985; HAKANSSON et al., 1990).

Como o eosinófilo entra na via aérea foi investigado em cobaias na década de 90 (WEGNER et al., 1990; RUGGERO et al., 1992). Encontrou-se indícios de que a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) é importante para a adesão dos eosinófilos ao endotélio e

sua migração nos tecidos inflamados durante a reação alérgica. As citocinas aumentam a concentração de ICAM-1 no epitélio brônquico aumentando a migração de eosinófilos e conseqüentemente a inflamação e a hiperreatividade brônquica.

BUSSE e SEDGWICK (1992) comentam os trabalhos de YUKAWA et al. que demonstraram a necessidade de haver um fator de "ativação" dos eosinófilos para que ocorra a migração e a inflamação. O fator de ativação plaquetária (PAF) e eosinófilos não-ativados, somente se aplicados juntos, produzem lesões no epitélio brônquico demonstrando assim a importância da ativação destas células pelo PAF.

A ativação de células endoteliais vasculares, pela interleucina 1 (IL-1), induz os eosinófilos a uma migração para estas células. O mesmo ocorre com a interleucina 3, interleucina 5, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e a citocina "RANTES" que também induz a migração dos eosinófilos mas não dos neutrófilos (EBISAWA et al., 1993).

A citocina "RANTES" foi originalmente identificada como um gen específico para induzir células T. Participa de diversas reações imunológicas que promovem a migração de linfócitos T e eosinófilos aos locais de inflamação. A fase tardia da reação ao teste alérgico na pele de pacientes atópicos (infiltrado de células T de memória e acúmulo de eosinófilos) poderia representar um possível exemplo clínico. A citocina "RANTES" também é liberada por plaquetas. Cobaias apresentavam uma menor infiltração pulmonar por eosinófilos quando havia depleção de plaquetas previamente à broncoprovocação com antígenos ou estimulação pelo fator de ativação plaquetária. Este fato ocorria apenas com eosinófilos e não com neutrófilos (KAMEYOSHI et al., 1992; EBISAWA et al., 1993; YAMADA et al., 1993; ALAM et al., 1993).

IYER et al. (1993) estudando eosinófilos humanos, observaram que "RANTES" pode ativar a liberação de proteína catiônica eosinofílica (ECP).

Outras citocinas como a interleucina 8 (IL-8), promove a migração de neutrófilos nos processos inflamatórios como traumas, artrite reumatóide, etc. e também pode promover migração de eosinófilos (BAGGIOLINI et al., 1989; SEHMI et al.,

1993, ERGER e CASALE, 1993).

Os mecanismos de atração e migração dos eosinófilos às vias aéreas, assim como a descoberta do ICAM -1 e da citoquina "RANTES" complementaram o entendimento da reação inflamatória na asma. Atualmente acredita-se que o eosinófilo pode induzir a produção de proteínas Classe II do Complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e ele poderia funcionar como uma célula apresentadora de antígeno (WELLER, 1994).

A Hiperreatividade brônquica (HRB) é uma condição que promove um estreitamento anormal das vias aéreas provocada por diversos estímulos (MOK e SIMPSON, 1984; BRITTON e TATTERSFIELD, 1986; CLOUGH e HOLGATE, 1989; BIERMAN e SHAPIRO, 1989).

WOOLCOCK e PEAT (1989) demonstraram uma forte relação entre hiperreatividade e a gravidade da asma mas pouca especificidade e sensibilidade em relação ao seu diagnóstico. Relataram também a existência de outras doenças que causam mudanças na resposta brônquica, como as infecções respiratórias virais, exposição a produtos químicos, fibrose cística, tabagismo passivo ou ativo, etc.

A prevalência da HRB mostrou-se diferente entre as populações de diversos países, entre crianças e adultos e também em relação à asma (WOOLCOCK et al., 1987; RIJCKEN et al., 1987; BURNEY et al., 1987).

Do ponto de vista epidemiológico existem duas questões fundamentais:

- a) qual a relação entre inflamação e HRB ?
- b) quais são os valores do fator genético e dos fatores ambientais em relação à HRB ?

Existe poucos estudos epidemiológicos em relação a hiperreatividade brônquica uma vez que há maior atenção ao binômio inflamação e asma. Vários fatores, tanto genéticos quanto ambientais podem estar envolvidos.

1 ATOPIA

Pacientes atópicos com rinite alérgica, eczema, asma ou pacientes não-atópicos com asma intrínseca, podem apresentar HRB.

BURNEY et al. (1987) observaram em asmáticos jovens que a positividade do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata era um fator importante de associação com hiperreatividade brônquica. Entretanto outros autores, consideram que estas duas entidades, atopia e HRB são independentes, uma vez que em estudos populacionais havia diferenças nas suas prevalências (COCKCROFT et al., 1979; SIBBALD et al., 1980).

2 INFECÇÃO

Apesar de não ser conhecido seu mecanismo exato, a infecção das vias aéreas é um importante mecanismo para desenvolver, manter ou exacerbar a HRB. Infecções respiratórias como coqueluche, laringite, bronquiolite, etc., em idade precoce podem resultar em HRB (HORN et al., 1979; GURWITZ et al., 1981; PULLEN e HEY, 1982; JOHNSTON et al., 1986).

Em alguns casos de bronquiolite, havia lesões bronquiolares e HRB. Os autores sugeriram também que havia uma maior susceptibilidade de alguns indivíduos para desenvolver a doença (PULLEN e HEY, 1982).

FRICK (1986) observou 13 pacientes desde o nascimento, que tinham pais atópicos. Destes, 11 desenvolveram alergia e infecção respiratória antes dos dois meses de vida. Demonstrou que as infecções virais contribuem para a sensibilização das vias aéreas e para as alterações na imunorregulação da IgE. As infecções virais exacerbaram a resposta brônquica à metacolina durante muitas semanas. Estas alterações não estão restritas a pacientes asmáticos ou a indivíduos que haviam demonstrado previamente HRB mas podem ocorrer em indivíduos normais. Posteriormente a uma infecção respiratória, a lesão provocada no epitélio brônquico

leva três a seis semanas para regenerar-se, enquanto isso, permanecem expostos os receptores para irritantes, que são estimulados e aumentam a sensibilidade a agentes irritantes inespecíficos (FRICK et al., 1979).

A hipótese de que o vírus induzia a inflamação das vias aéreas, aumentando a permeabilidade aos antígenos, razão pela qual se elevariam os níveis de imunoglobulina E, foi testada por SAKAMOTO et al. (1984). Para isso, usaram em cobaias, inalações de ovoalbumina e posterior dosagem de IgE específica à ovoalbumina, encontrando valores elevados.

Em estudos prospectivos e controlados, alguns autores não demonstraram alterações significativas na HRB em um grupo de pacientes asmáticos e outros de pacientes não-asmáticos com infecção respiratória quando submetidos à broncoprovocação com histamina e metacolina (JENKINS e BRESLIN, 1984; JOSEPS et al., 1987). Entretanto outros autores (EMPEY et al., 1976; COCKCROFT et al., 1979; PLATTS-MILLS et al., 1982) demonstraram por meio de broncoprovocação, que infecções das vias aéreas, drogas, alérgenos específicos e inespecíficos, alterações climáticas, alterações endócrinas, etc., podem alterar esta resposta de acordo com o momento em que estas provas são realizadas.

3 FATOR GENÉTICO

As vias aéreas apresentam mecanismos de defesa contra estímulos exógenos. A asma representa uma resposta exagerada destes mecanismos frente a estes estímulos. Estudos realizados em cobaias e humanos, mostraram que estas respostas dependem tanto dos fatores ambientais como do fator genético (PAUWELS, 1989; CLOUGH e HOLGATE, 1989).

As vias aéreas são controladas por um mecanismo complexo, responsável por manter as funções fisiológicas e de defesa. Observações "in vitro" de material proveniente de cobaias e humanos, mostrou que havia diferenças individuais na

contração da musculatura lisa brônquica. O isolamento destes músculos em pacientes asmáticos e indivíduos normais, mostrou que não existe uma anormalidade própria desta musculatura. Nos asmáticos, a broncoprovocação apresenta maior resposta em relação aos indivíduos normais que poderia ser determinada pelas alterações da IgE, que por sua vez, é controlada por mecanismos genéticos (DRAZEN et al., 1989).

Estudos realizados em familiares de gemelares sugerem que a HRB é determinada geneticamente. PAUWELS (1989) cita o trabalho de TOWNLEY et al., que estudaram familiares assintomáticos de pacientes com asma e de indivíduos normais, por meio de broncoprovocação, encontrando aumento na resposta brônquica à metacolina nos dois grupos.

GODFREY e KONIG (1974) encontraram melhor correlação para asma induzida por exercício (AIE) em gemelares homozigóticos do que em dizigóticos e maior frequência de asma em familiares de pacientes asmáticos do que na população geral. Encontraram também, aumento da HRB em parentes sadios de pacientes asmáticos.

DRAZEN et al. (1989) sugeriram que um músculo sensibilizado previamente com antígenos, poderia alterar sua resposta de contração, contrariando estudos anteriores. A associação entre sensibilização e inflamação, apesar de serem mecanismos não bem conhecidos, determinarão no futuro um melhor conhecimento da extensão e da natureza do processo inflamatório. Os mediadores produzidos por eosinófilos e outras células, são um poderoso mecanismo de contração da musculatura brônquica e de alterações no balanço hídrico das células. Os mediadores são capazes de aumentar as secreções, não só às custas de secreção de glândulas, mas principalmente pela exsudação de plasma nas vias aéreas (LAITINEN et al., 1985; PERSSON, 1986; RICHARDSON e PLEATFIELD, 1987).

Para a avaliação da HRB, os testes de provocação por agentes inalados são largamente utilizados na investigação de doenças pulmonares como a asma e outras doenças de hipersensibilidade. Vários agentes diferentes podem ser usados para estas provas e são subdivididos em:

- a) Agentes "não-seletivos": agonistas colinérgicos (acetilcolina, metacolina e carbacol), aminas vasoativas (histamina e serotonina), peptídios vasoativos (bradicinina) e metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandina F2 alfa). Outros agentes, como a inalação de ar frio, gases irritantes, exercício físico e hiperventilação também pertencem a este grupo;
- b) Agentes "seletivos": também chamados alérgicos ou imunológicos (*D. pteronyssinus*, pólen, etc.).

Os métodos para a avaliação da HRB são conhecidos há várias décadas. Com a padronização (ROSENTHAL et al., 1979; COCKCROFT e BERSCHIED, 1982; COCKCROFT, 1985, 1987; CHAI, 1988; TRIGG e DAVIES, 1989) obteve-se boa reprodutibilidade da técnica. Outra dificuldade foi o estabelecimento da dose-resposta, uma vez que inicialmente só se considerava a positividade ou negatividade. Com a padronização verificou-se que estas reações eram dose-dependentes. Há vários fatores chamados técnicos e não-técnicos que são necessários para a perfeita padronização.

Uma técnica rápida de triagem para avaliar a hiperreatividade brônquica, consiste na medida basal do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) seguida de cinco inalações, na concentração de 5mg/ml de metacolina por inalador de alto fluxo com máscara facial. Caso não haja nenhuma diminuição no VEF₁, procede-se mais cinco inalações de 25 mg/ml de metacolina, bem como nova medida do VEF₁. O teste é considerado positivo quando houver uma diminuição igual ou superior a 20% no VEF₁ (CHATHAM et al., 1982).

As indicações das provas para a medida da HRB tem aumentado nos últimos anos devido ao inegável auxílio diagnóstico a que se presta. A caracterização da HRB e a elucidação de fenômenos fisiopatológicos e farmacológicos, são as principais indicações (SPECTOR et al., 1976; SHAPIRO et al., 1982; LOWHAGEN e RAK, 1985; ADINOFF et al., 1988; BRAMAN e CORRAO, 1989).

Com esta revisão enfocando o eosinófilo, suas propriedades e mediadores na asma, nos propusemos a avaliar em parte, o mecanismo de inflamação na doença. A

inflamação crônica das vias aéreas está associada à hiperreatividade brônquica que pode ser determinada por parâmetros clínicos e laboratoriais. Em um grupo de crianças e adolescentes, alguns destes parâmetros foram correlacionados à gravidade da doença, à hiperreatividade e aos anticorpos IgE circulantes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1) Verificar o papel dos eosinófilos na asma atópica por meio da: a) contagem de eosinófilos no sangue; b) porcentagem de eosinófilos hipodensos; c) valores da proteína catiônica eosinofílica na amostra.

- 2) Estudar a relação entre eosinófilos e: a) gravidade da asma; b) grau de hiperreatividade brônquica à metacolina; c) níveis de IgE total e de anticorpos IgE específicos ao *Dermatophagoides pteronyssinus*.

CASUÍSTICA

CASUÍSTICA

1 POPULAÇÃO ESTUDADA

1.1 PACIENTES

Foram selecionadas 43 crianças e adolescentes com asma, de ambos os sexos, de um grupo inicial de 120. As idades variaram entre 6 e 16 anos. Tanto os pacientes quanto seus responsáveis foram informados sobre a natureza do estudo, sendo obtido consentimento dos mesmos. Estes foram selecionados do ambulatório de Alergia, Imunologia e Pneumologia pediátrica do Hospital de Clínicas da U.F.PR. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Clínicas - U.F.PR.

1.2 CONTROLES

Foram selecionadas 18 crianças não-atópicas, de ambos os sexos e com idades variando entre 8 e 15 anos, encaminhadas de um programa de atividades esportivas da Secretaria de Esportes e Turismo do Paraná.

2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

2.1 Pacientes com asma alérgica, observando-se a definição do Programa Internacional de Educação para Asma do Departamento de Saúde Pública Americano (1992). Admitiu-se como prova da reversibilidade da obstrução das vias aéreas uma resposta maior do que 10% no VEF₁ após o uso de broncodilatador inalado (MUELLER e EIGEN, 1992).

2.2 Teste cutâneo alérgico de resposta imediata positivo ao extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus* pela técnica de puntura (PEPYS, 1975).

2.3 Pacientes não submetidos a corticoterapia, uso de cromoglicato ou imunoterapia em um intervalo igual ou inferior a quatro semanas. Broncodilatadores utilizados em um intervalo igual ou inferior a doze horas (TRIGG e DAVIES, 1989).

2.4 Ausência de sinais clínicos de viroses respiratórias por um período igual ou inferior a seis semanas.

2.5 Ausência de parasitoses intestinais verificadas por exames parasitológicos para ovos e larvas em 3 amostras diferentes.

2.6 Pacientes cooperativos na realização de provas de função pulmonar e para a colheita de outros exames.

2.7 Crianças normais em número de 18, sem história de doenças respiratórias, com teste cutâneo alérgico de leitura imediata negativo ao *Dermatophagoides pteronyssinus* e sem parasitoses foram consideradas para o grupo controle. Estas foram submetidas também a exame clínico e provas de função pulmonar.

2.8 Para classificação da gravidade da asma usamos os critérios preconizados por Aas (1981), que divide em 5 classes:

I - paciente com até 5 crises anuais que melhoram com broncodilatadores e apresentam função pulmonar aparentemente normal.

II - paciente com 5 a 10 crises anuais, com intervalos assintomáticos prolongados e função pulmonar aparentemente normal.

III - paciente com mais de 10 crises anuais, com intervalos assintomáticos e função pulmonar aparentemente normal.

IV - paciente com mais de 5 crises anuais com prolongada obstrução e alterações na função pulmonar. Necessidade de tratamento contínuo e corticoterapia.

V - paciente com incapacitação e exacerbações agudas graves. Função pulmonar muito alterada.

Os pacientes asmáticos foram divididos em dois grupos chamados Asma I que englobam as classes I, II e III de Aas e Asma II que englobam as classes IV e V. O primeiro seria dos pacientes com até dez crises anuais, boa resposta a broncodilatadores e função pulmonar aparentemente normal. O segundo seria dos pacientes com obstrução prolongada das vias aéreas, geralmente necessitando terapia com corticóides e com função pulmonar alterada.

3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

3.1 Presença de doenças associadas a asma como nefropatias, cardiopatias, etc.

3.2 Pacientes com exames parasitológicos de fezes positivos.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1 MATERIAIS

- Espirômetro tipo selo d'água, Collins com capacidade de 10 litros (cat. número P 1400, Warren and Collins Incorporated. 220 Wood Road Braintree, Massachussets, U.S.A.).

- Mini Wright Peak Flow Meter (cat. número PF-239, Armstrong Industries In. North Brook, Illinois, U.S.A.).

- Acetyl-B Methylcholine Chloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.).

- Fenoterol (100 mcg) e brometo de ipratrópio (40 mcg) aerossol (Boehringer De Angeli Química e Farmacêutica Ltda.).

- Aerocâmara 750 ml (Volumatic Trade Mark - Allen and Hanburys Ltda. Greenford, England).

- Nebulizador De Vilbiss série 561 com nebulímetro 646 (Somerset, Pennsylvania, U.S.A.)

- Extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus* 1.500 PNU/ml (Merck S/A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro - RJ.).

- Agulhas hipodérmicas 10/5 (Indústrias cirúrgicas e ópticas S/A. Campinas - SP.)

- Balança analítica (Meteer-Zürich, Suíça).

- Percoll (1.129 mg/ml pH 8.9, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden).
- Ficoll-Hipaque 1.077 g/ml (Sigma Chemical Co.).
- Solução de Hanks 1X (Central de soluções do Hospital de Clínicas - U.F.PR.).
- Solução de Hanks 1X com cálcio e magnésio (Central de soluções do H.C. - U.F.PR.).
- Solução de Hanks 10X (Central de soluções do H.C. - U.F.PR.).
- "Density marker beads" (Sigma Chemical Co.).
- Sistema Vacutainer para coleta de amostras sanguíneas com e sem heparina (B.D. Becton, Dickinson Indústrias cirúrgicas LTDA. Juiz de Fora - MG.).
- Dextran PM 250.000 (Sigma Chemical Co.).
- Tris (hydroxymethyl - aminomethan), (Merck Co.).
- Ácido clorídrico 0,1 N (Central de soluções do H.C. - U.F.PR.).
- Corante azul de tripano 1% (Central de soluções do H.C. - U.F.PR.).
- Pipetas de Pasteur (Corning. Park Ridge. Illinois, U.S.A.).
- Tubos cônicos de 15 e 50 ml (Corning. U.S.A.).
- Osmômetro Osmette (Precision systems. Waltham, Massachussets, U.S.A.).
- Centrífuga Parsec mod. B-8. (Parsec - São Paulo, SP.).
- Ultracentrífuga refrigerada Beckman modelo J-21 com rotor em ângulo fixo (Beckman instruments inc. Palo Alto, California, U.S.A.).
- Câmara de Neubauer (Resistance W, Germany).
- Soro bovino fetal (Laborclin Ltda. Curitiba, PR.).
- Albumina bovina (Sigma Chemical Co.).
- Cytospin 2 e papel filtro (Shandon Southern Instruments, Inc. Pennsylvania, U.S.A.).
- Lâminas e Lamínulas (Objekttrager, Knittel - Gleser, Germany).
- Microscópio (Wil Heebugg - 22310 - Switzerland).
- Corante May-Grünwald e Giemsa (Central de soluções do H.C. U.F.PR.).
- Fixador para lâminas (Entellan - Merck S/A.).

- Freezer -20 graus modelo F-21 (Refrigeração Paraná S/A).
- Freezer -80 graus (Indrel - IULT 200, São Paulo SP).
- Micropipetas (CELM. Barueri, SP).
- Picnômetro (G.G., U.S.A.).
- Estufa S.F. (Fanen S/A. São Paulo - SP).
- pH metria de soluções (Radiometer - PH METER 28-b. Copenhagen).
- Contador modelo D2 (Coulter Eletronics Indústria e Comércio Ltda. Planalto Paulista - SP).
- Contador ICN gama 10 (ICN Micromedic Systems, Alabama, U.S.A.).
- "Kit" IgE total - RIA (Pharmacia, Uppsala, Sweden).
- "Pharmacia CAP System" (Pharmacia, Uppsala, Sweden).
- "Kit" ECP - RIA (Pharmacia, Uppsala, Sweden).
- Fluorocount 96 (Pharmacia, Uppsala, Sweden).
- Glutaraldeído 2% (Sigma Chemical Co.).
- Paraformaldeído 4% (Sigma Chemical Co.).
- Cloreto de cálcio (Sigma Chemical Co.).
- Tampão cacodilato (Sigma Chemical Co.).
- Tetróxido de ósmio 1% (Sigma Chemical Co.).
- Acetato de uranila (Sigma Chemical Co.).
- Citrato de chumbo (Sigma Chemical Co.).
- Microscópio eletrônico EM 300 (Phillips, U.S.A.).

2 MÉTODOS

2.1 ANAMNESE E TESTE CUTÂNEO DE LEITURA IMEDIATA

Os indivíduos do estudo e controles foram submetidos inicialmente a anamnese alergológica e exame clínico pelo autor. Foi realizado teste cutâneo alérgico de leitura imediata para *Dermatophagoides pteronyssinus*, pela técnica de puntura (PEPYS, 1975). O teste foi considerado positivo quando apresentou pápula > 2 mm.

2.2 PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR

Foram realizadas 3 espirometrias e escolhidos os melhores valores para a medida da capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) e o Índice de Tiffeneau (VEF₁/CV) através do espirômetro Collins 10 litros. O pico de fluxo expiratório (PFE) foi obtido pelo "Mini Wright Peak Flow Meter". Foram observadas as recomendações da ATS (1987) para estes procedimentos e os valores de referência estabelecidos por POLGAR e PROMADHAT (1971).

2.3 PROVOCAÇÃO BRÔNQUICA

Os pacientes e os do grupo controle que apresentassem VEF₁ superior a 80% do valor normal foram submetidos à provocação brônquica com metacolina para avaliação da hiperreatividade brônquica, por meio da triagem proposta por CHATHAN et al. Foram submetidos a inalações com soro fisiológico, seguido de doses crescentes e não-cumulativas de metacolina (0,025 a 25 mg/ml) por meio de nebulizador De Vilbiss com

nebulímetro 646 e máscara facial. Processavam-se cinco inalações profundas e rítmicas, aguardava-se cinco minutos e repetia-se as provas de função respiratória. A prova era considerada positiva quando o VEF₁ sofria diminuição igual ou superior a 20%, valor chamado DP₂₀. Em seguida, era realizada a prova broncodilatadora inalando-se fenoterol e brometo de ipratrópio na dose de 400 e 160 mcg respectivamente por meio de aerocâmara com 750 ml. de volume. Aguardava-se intervalo de quinze minutos e eram repetidas as provas respiratórias (MUELLER e EIGEN, 1992). Nenhum dos indivíduos apresentou intercorrências durante a realização das provas e foram encaminhados a suas casas com orientações sobre os medicamentos broncodilatadores em uso.

A metacolina foi preparada em frascos esterilizados, fechados com selo de alumínio na concentração de 100 mg. As diluições foram feitas em soro fisiológico, sempre no dia do exame.

Quanto ao grau de hiperreatividade brônquica (HRB), classificamos em HRB ausente os indivíduos com a prova negativa à inalação de 25 mg/ml de metacolina. Quando presente, foi subdividida em HRB leve para os indivíduos que apresentaram a prova positiva com doses iguais ou superiores a 20 mg/ml HRB moderada para indivíduos que apresentaram a prova positiva entre 2 e 20 mg/ml e HRB intensa ou grave para valores entre 0,025 e 2 mg/ml.

2.4 PARASITOLÓGICO DE FEZES

Foram realizados exames parasitológicos de fezes em três amostras, pelos métodos de Faust, Hoffman et al. e de Rugai para pesquisa de ovos, cistos e larvas de enteroparasitas (PESSÔA, 1954).

2.5 COLETA DE SANGUE E HEMOGRAMA

Foram colhidos por meio do sistema Vacutainer amostras de 20 ml de sangue venoso distribuídas em frascos heparinizados e não-heparinizados e preparado esfregaço em três lâminas para a contagem diferencial de leucócitos. O sangue sem anticoagulante foi deixado em temperatura ambiente durante 60 minutos. Após a retração do coágulo o soro foi separado por centrifugação e congelado a -80°C até sua utilização. O hemograma foi realizado pelo sistema Coulter e contagem diferencial manual de duzentas células e o resultado expresso em mcl/ml. As amostras foram obtidas entre 8:00 e 9:00 horas. Em um estudo piloto prévio, a técnica de fracionamento de eosinófilos foi realizada em duplicata em vinte indivíduos adultos saudáveis. Foi observada variação menor que 5% nas contagens finais dos eosinófilos hipodensos.

2.6 FRACIONAMENTO DE EOSINÓFILOS PELA DENSIDADE

2.6.1 Suspensão de granulócitos

O conteúdo do frasco de sangue heparinizado (15 ml) foi colocado em um tubo cônico de 50 ml contendo 4 ml de dextran a 4,5% em solução salina a 0,15 molar tamponada com tris a um pH de 7,4. A solução foi deixada para sedimentação durante quarenta e cinco minutos a 22°C , observando-se a sedimentação das hemácias e a formação de sobrenadante rico em linfócitos e granulócitos.

A quantidade de 7 ml deste sobrenadante foi cuidadosamente depositada em um tubo cônico de 15 ml contendo 3 ml da solução de Ficoll-Hipaque (densidade 1.077 g/ml) sem que houvesse mistura das soluções. A centrifugação a 1800 r.p.m. durante vinte minutos leva a formação do anel de linfócitos que posteriormente era eliminado deixando-se apenas o botão celular contendo granulócitos e hemácias (BOYUM, 1968).

Este botão foi misturado em 3 ml de solução salina de Hanks 1X, sem cálcio e magnésio, por meio de pipeta de Pasteur, evitando manobras bruscas e a formação de espuma que contribuem para lise celular. Deixada em repouso por cinco minutos foi em seguida centrifugada. Este procedimento foi repetido uma segunda vez para a retirada de todo o Ficoll-Hipaque remanescente. Por fim, a solução foi ressuspensa em solução salina de Hanks 1 X, com cálcio e magnésio e 100 microlitros de soro bovino fetal para a proteção das membranas celulares. A solução era ajustada a uma concentração de 20×10^6 granulócitos/ml. A viabilidade das células foi testada através do corante azul de tripano mostrando 98% de células vivas.

2.6.2 Preparação do Percoll

Utilizou-se Percoll com densidade 1.124 g/ml e osmolalidade de 17 mOsm/Kg H₂O, que foi diluído em solução salina de Hanks 10X até atingir a osmolaridade de 330 mOsm/l. Esta solução é chamada estoque ou solução pesada e consistiu em uma mistura de 9 ml de Percoll com 1 ml de HBSS 10X (GARTNER, 1980).

A solução pesada foi diluída em 4,9 ml de solução salina de Hanks 1X, sem cálcio e magnésio que apresentou densidade de 1.084 g/ml e osmolaridade de 270 mOsm/l, chamada solução leve. As osmolaridades foram aferidas através de osmômetro digital.

As densidades foram calculadas pelo picnômetro pesado em balança analítica e aplicando-se a fórmula onde:

$$V.S.E. \times \frac{D.S.E - D. desejada}{D. desejada - D. HBSS 1X} = V. HBSS 1X$$

V.S.E. = volume da solução estoque de Percoll em ml.

D.S.E. = densidade da solução estoque de Percoll.

D. desejada = densidade desejada.

D. HBSS 1X = densidade da solução HBSS 1X.

V. HBSS 1X = volume da solução de HBSS 1X necessária em ml.

2.6.3 Autogeração dos gradientes de Percoll

Foram colocados em um tubo cônico de 15 ml, a quantia de 10 ml de Solução leve (Percoll densidade 1.084 g/ml) e centrifugado a 16.000 r.p.m. durante trinta minutos para autogeração dos gradientes. A formação destes gradientes foi confirmada através da centrifugação conjunta de um tubo controle contendo marcadores de densidades ("Density marker beads") que vão desde 1.018 a 1.139 g/ml (FRICK et al., 1988).

Após a autogeração dos gradientes, são colocados 2 ml da suspensão de granulócitos cuidadosamente sobre a solução de Percoll e em seguida centrifugada a 1.100 r.p.m. durante vinte minutos. Aparecem então várias bandas que foram classificadas de I a V, conforme a densidade (tabela I). A banda I (densidade 1.018 a 1.063 g/ml) apresenta Percoll com pequenas quantidades de células. A banda II (dens. 1.063 a 1.076 g/ml) apresenta grande concentração de neutrófilos e eosinófilos hipodensos, podendo-se observar alguns linfócitos. A banda III (dens. 1.076 a 1.088 g/ml) apresenta eosinófilos normodensos. A banda IV (dens. 1.088 a 1.099 g/ml) apresenta grande quantidade de hemácias. Por último a banda V (dens. 1.099 a 1.133 g/ml) que apresentou células em ínfima quantidade.

TABELA I - AUTOGERAÇÃO DE GRADIENTES DE CÉLULAS POR MEIO DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO E USO DA TÉCNICA DO PERCOLL

BANDA	DENSIDADE	CELULARIDADE
I	1.018-1.063 g/ml	algumas células.
II	1.063-1.076 g/ml	neutrófilos, eos. hipodensos.
III	1.076-1.088 g/ml	eos. normodensos.
IV	1.088-1.099 g/ml	hemácias.
V	1.099-1.133 g/ml	algumas células.

Estas bandas foram retiradas individualmente e colocadas em tubos plásticos acrescidos de albumina a 10% em solução salina de Hanks 1X sem cálcio e magnésio para proteção das membranas celulares. Através de contagens sucessivas em câmara de Neubauer, as concentrações celulares foram ajustadas em 10^6 células/ml. Em seguida, foram centrifugadas a 1000 r.p.m. durante cinco minutos, ressuspensas e colocadas no Cytospin a 500 r.p.m. durante dez minutos, para o processamento da lâmina. Esta foi corada pelo método de May-Grünwald e Giemsa, seca e observada em imersão.

Procedeu-se a contagem de cem células de cada banda para determinação do percentual de eosinófilos hipodensos e normodensos. A técnica de fracionamento de células por densidades, com Percoll, foi realizada pelo autor, no Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas - U.F.PR.

2.7 DOSAGEM DE IGE TOTAL

A IgE total no soro foi determinada por radioimunoensaio. A IgE do soro (quantidade desconhecida) e a IgE marcada com I^{125} (quantidade fixa) competem entre si para se ligarem aos sítios específicos para estes anticorpos. As frações livres e ligadas à IgE são separadas pelo uso de uma suspensão de duplo anticorpo imunoabsorvente. Em seguida procede-se a centrifugação e decantação. O precipitado obtido é colocado no contador gama, sendo a radioatividade do precipitado inversamente proporcional à quantidade de IgE presente na amostra (BUCKLEY e BECKER, 1978).

Os resultados obtidos são comparados aos da curva padrão, que utiliza concentrações de IgE entre 2 e 1000 UK/l. Os valores de IgE total foram determinados no Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas - U.F.PR.

2.8 DOSAGEM DE IgE ESPECÍFICA

Anticorpos IgE específicos para o *D. pteronyssinus* foram determinados por radioimunoensaio através do "CAP System Pharmacia". Este método é uma modificação do tradicional "RAST" (teste radioalergoabsorvente) que utiliza um processo automatizado e a fase sólida "immuno CAP". Este é um polímero hidrofílico de celulose, encapsulado com uma tela que permite maior contato com o soro a ser testado. Valores de referência da IgE específica ao *D. pteronyssinus* pelo "CAP System - RIA" (BOUSQUET et al., 1990b):

Classe 0: (não detectável) < 0,35 UK/l

Classe 1: (valores muito baixos) 0,35 - 0,7 UK/l

Classe 2: (valores baixos) 0,70 - 3,5 UK/l

Classe 3: (valores moderados) 3,5 - 17,5 UK/l

Classe 4: (valores elevados) 17,5 - 50 UK/l

Classe 5: (valores muito elevados) 50 - 100 UK/l

Classe 6: (valores extremamente elevados) >100 UK/l

Os valores da IgE específica ao *D. Pteronyssinus* foram determinados no Laboratório Fleury Ltda. (SP).

2.9 PROTEÍNA CATIÔNICA EOSINOFÍLICA (ECP)

Os níveis séricos de ECP foram determinados por fluoroenzima imunoensaio que utiliza anticorpos monoclonais de camundongo anti-ECP e a enzima beta-galactosidase. A reação é fluorimétrica e medida no Fluorocount 96. A fluorescência é diretamente proporcional à concentração de ECP da amostra. Os valores das amostras são comparadas a uma curva de referência com concentração de 2, 5, 15, 100 e 200 mcg/l (VENGE et al., 1977). O tempo para a retração do coágulo foi de 60 minutos e o soro foi

guardada à temperatura de - 80°C.

Valor de referência (Pharmacia): 5,8 mcg/l ou 1,8 a 18 mcg/l.

Os níveis de ECP foram determinados pelo Laboratório Weimann Ltda. (RS).

2.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Foram estudados, por meio de microscopia eletrônica (M.E.), os eosinófilos de indivíduos normais e pacientes asmáticos para avaliação morfológica das células existentes nas bandas separadas previamente. As bandas foram coletadas e manipuladas em tubos Ependorf siliconizados, para evitar aderência das células ao tubo. O material foi transportado imediatamente em gelo, para fixação, que ocorreu em uma solução contendo glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4% e cinco milimolar de cloreto de cálcio em tampão cacodilato 0,1 molar, pH 7,2.

Depois de uma hora, as células eram lavadas no mesmo tampão e a seguir fixadas em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cinco milimolar de cloreto de cálcio diluído em tampão cacodilato 0,1 molar.

Foram desidratadas em acetona e incluídas em epon. Os cortes realizados com ultramicrotomo, plicados em gradinha de cobre e contrastados com acetato uranila e citrato de chumbo, foram observados ao M.E. (BUCHI e SOUZA, 1992). Os trabalhos por M.E. foram realizados no Setor de Ciências Biológicas da U.F.PR.

2.11 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Todas as variáveis em estudo foram submetidas a análise da variância. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, onde os diagnósticos estatísticos 0 (Normal), I (Asma I) e II (Asma II), foram considerados como tratamento e os

pacientes como repetições. Para algumas variáveis, o número de repetições foi diferente entre os diagnósticos. Os quadrados médios para os tratamentos foram comparados com os do erro usando-se o teste F. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Foram feitas as correlações de Spearman, envolvendo alguns pares de variáveis. A significância destas, foi testada pelo teste t de Student. Este também foi usado para comparar a média de IgE total entre indivíduos normais com e sem antecedentes familiares de doenças alérgicas. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para verificar a dependência entre HRB e de gravidade da asma. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliação e comparação das médias da proteína catiônica eosinofílica (SIEGEL, 1975; SPIEGEL, 1977; GOMES, 1987; VIEIRA e HOFFMANN, 1989).

RESULTADOS

RESULTADOS

1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS

As características antropométricas dos três grupos estudados, são apresentados na tabela II. As médias comparadas por meio do teste de Tukey não são diferentes entre os grupos, indicando que as amostras eram homogêneas no que diz respeito à idade, peso e altura. Não houve diferença significativa quanto à frequência dos sexos (Qui-Quadrado calculado: 0,92, $p < 0,63$).

TABELA II - CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DA CASUÍSTICA AVALIADA

GRUPO	n	IDADE (anos)*	PESO (Kg.)*	ALTURA (cm.)*	SEXO(m:f)#
NORMAL	18	10,8 a \pm 0,4 (8-15)	35,0 a \pm 2,1 (22-60)	141,8 a \pm 2,7 (121-162)	8:10
ASMA I	20	10,5 a \pm 0,4 (6-14)	35,0 a \pm 1,8 (22-53)	141,4 a \pm 2,3 (125-158)	12:8
ASMA II	23	11,6 a \pm 0,4 (9-16)	38,4 a \pm 1,8 (27-55)	147,1 a \pm 1,8 (129-163)	12:11

Média \pm EPM; () limites.

* Tukey: N.S. quando as letras são iguais.

Qui-Quadrado calculado: 0,92, $p < 0,63$.

2 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS

A distribuição individual do peso e altura em relação à idade cronológica e sexo dos grupos estudados, segundo as tabelas antropométricas de TANNER e WHITEHOUSE para crianças normais, são apresentadas nos anexos (TANNER et al., 1966).

Os indivíduos normais tinham peso e altura entre o terceiro e nonagésimo sétimo percentis, independentemente do sexo. A maioria concentrou-se em torno do percentil cinquenta.

Os pacientes do grupo Asma I, de ambos os sexos, tinham altura e peso normais para a idade. Três pacientes do sexo masculino apresentaram-se acima do nonagésimo sétimo percentil para altura e um paciente para o peso.

Os pacientes do grupo Asma II, de ambos os sexos, também tinham altura e peso normais para a idade, à exceção de 2 pacientes do sexo feminino que apresentavam altura e um paciente o peso, abaixo do terceiro percentil.

3 PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR

3.1 Foram avaliadas a capacidade vital forçada (CVF), o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), o pico de fluxo expiratório (PFE) e também a hiperreatividade brônquica (HRB) à metacolina com determinação da DP_{20} . Para a determinação e comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey e para análise de frequências, o teste de Qui-Quadrado.

A média do VEF_1 no grupo de indivíduos normais foi 98,3% do normal; para os pacientes do grupo Asma I, 92,3 % e para os pacientes do grupo Asma II, 74,3%. Não houve diferença significativa quando comparados os indivíduos normais com pacientes do grupo Asma I, enquanto que houve diferença ($p < 0,01$) quando os normais foram

comparados aos do grupo Asma II. O PFE apresentou as mesmas diferenças observadas para o VEF₁ e não houve diferença significativa entre as porcentagens da CVF (tabela III).

TABELA III - RESULTADOS DAS PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR POR MEIO DA CAPACIDADE VITAL FORÇADA (CVF), VOLUME EXPIRATÓRIO FORÇADO NO PRIMEIRO SEGUNDO (VEF₁) E PICO DE FLUXO EXPIRATÓRIO (PFE)

GRUPO	n	CVF (%)	VEF ₁ (%)	PFE (%)
NORMAL	18	100,7 a (77-127)	98,3 a (80-119)	115,0 a (94-129)
ASMA I	20	102,5 a (185-124)	92,3 a (80-109)	110,9 a (91-132)
ASMA II	23	90,1 a (63-129)	74,3 b (43-108)	89,6 b (51-123)

Média ; () limites.

Tukey: $p < 0,01$ quando as letras são diferentes.

N.S. quando as letras são iguais.

Observamos também maior HRB à medida em que aumentou a gravidade da asma. A DP₂₀ média dos indivíduos normais foi $23,8 \pm 12,1$ mg/ml de metacolina. Nos asmáticos do grupo Asma I a média foi de $11,5 \pm 2,5$ mg/ml enquanto no grupo Asma II foi de $2,0 \pm 0,6$ mg/ml. As diferenças entre as médias foram estatisticamente significantes ($p < 0,01$).

Quando avaliamos a frequência da HRB nos três grupos, fica demonstrado que há diferenças significativas entre os indivíduos normais e asmáticos mas não entre os grupos Asma I e Asma II (tabela IV). Apenas um indivíduo normal apresentou prova positiva à metacolina (DP₂₀= 3,2 mg/ml) quando provocado até a concentração de 25 mg/ml.

TABELA IV - FREQUÊNCIA DA HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA (HRB) NOS GRUPOS ESTUDADOS

GRUPO	HRB		
	AUSENTE (%)	PRESENTE (%)	TOTAL
NORMAL	17 (94)	1 (6)	18
ASMA I	7 (35)	13 (65)	20
ASMA II	0 (0)	11 (100)	11

Qui-Quadrado calculado: 27,1 , $p < 0,0001$.

Normal # (AsmaI = AsmaII)

Somente no grupo de asmáticos houve correlação significativa entre os valores do VEF₁ e PFE ($r = 0,56$, $p < 0,001$).

4 CONTAGENS DE LEUCÓCITOS E DIFERENCIAL NO SANGUE

As contagens do número de leucócitos, diferencial de eosinófilos e basófilos e porcentagens de eosinófilos hipodensos e normodensos, nos grupos estudados, foram realizadas e também comparadas as diferenças entre as médias, pelo teste de Tukey (tabela V).

As médias das contagens de leucócitos no sangue para os três grupos não revelou diferenças significativas. O grupo de indivíduos normais apresentou a média de $7237,5 \pm 331,3$ leucócitos/mm³ (limites: 5200-10800) enquanto nos asmáticos a média foi de $8478,0 \pm 496,5$ /mm³ (3050-20000).

A média da contagem de eosinófilos foi $200,1 \pm 27,9/\text{mcl}$ (limites: 52-399) no grupo de indivíduos normais, $704,7 \pm 125,3/\text{mcl}$ (107-1830) nos pacientes do grupo Asma I e $823,5 \pm 89,3/\text{mcl}$ (100-1802) nos do grupo Asma II. Houve diferenças significantes ($p < 0,01$) entre as médias dos indivíduos normais e dos asmáticos mas não entre os asmáticos dos grupos I e II.

TABELA V - NÚMERO DE LEUCÓCITOS, CONTAGEM DIFERENCIAL DE EOSINÓFILOS E BASÓFILOS E PORCENTAGEM DE EOSINÓFILOS HIPODENSOS NOS GRUPOS ESTUDADOS

GRUPO	n	leucócitos (/ mm^3)	eosinófilos (/mcl)	basófilos (/mcl)	eos. hipodensos (%)
NORMAL	18	7237,5 a \pm 331,3 (5200-10800)	200,1 b \pm 27,9 (52-399)	28,1 b \pm 8,7 (0-84)	11,7 b (4-29)
ASMA I	20	8397,5 a \pm 715,6 (3050-14800)	704,7 a \pm 125,3 (107-1830)	47,5 a \pm 10,5 (0-148)	37,7 a (6-60)
ASMA II	23	8547,0 a \pm 703,5 (4900-20000)	823,5 a \pm 89,3 (100-1802)	61,7 a \pm 12,1 (0-200)	39,8 a (15-78)

Média \pm EPM; () limites.

Tukey: $p < 0,01$ quando as letras são diferentes.

N.S. quando as letras são iguais.

A média da contagem diferencial de basófilos foi de $28,1 \pm 8,7/\text{mcl}$ (limites: 0-84) para o grupo de indivíduos normais, $47,5 \pm 10,5/\text{mcl}$ (0-148) para os pacientes do grupo Asma I e $61,7 \pm 12,1/\text{mcl}$ (0-200) para os pacientes do grupo Asma II. Houve diferença significativa entre as médias dos indivíduos normais e asmáticos, porém não entre os grupos Asma I e II.

As médias percentuais de eosinófilos hipodensos foi 11,7% (limites: 4-29) para o grupo de indivíduos normais, 37,7% (6-60) para os asmáticos do grupo I e 39,8% (15-63) para os pacientes do grupo Asma II. Houve diferença significativa entre indivíduos normais e asmáticos mas não entre os grupos Asma I e II.

Encontramos uma maior frequência de percentuais elevados de eosinófilos hipodensos em asmáticos (38/43) que nos normais (2/18) quando consideramos o limite normal de 18% estabelecido por FRICK et al. (1988). Não houve diferença entre os pacientes do grupo Asma I (17/20) e os do grupo Asma II (22/23) quanto a esta frequência se considerarmos o mesmo limite de normalidade. A distribuição individual dos eosinófilos hipodensos é mostrada na figura 1.

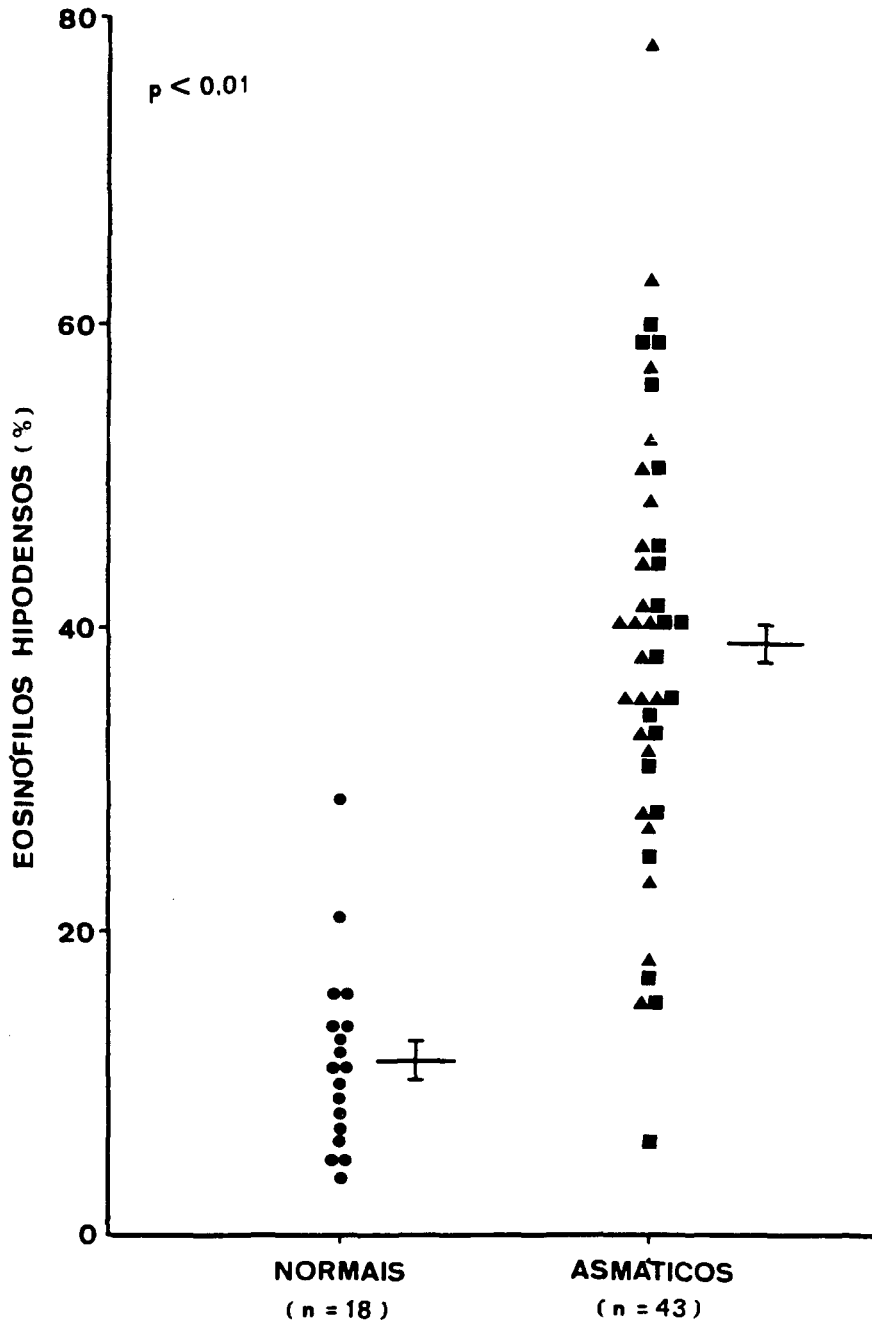


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS EOSINÓFILOS HIPODENSOS NOS INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES ASMÁTICOS

■ ASMA I ▲ ASMA II

5 NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA CATIÔNICA EOSINOFÍLICA (ECP)

A média dos níveis de proteína catiônica eosinofílica (ECP) determinada em onze indivíduos normais (11/18) foi $6,8 \pm 1,2$ mcg/l (limites: 2,6-15,9), enquanto que doze dos pacientes do grupo Asma I (12/20) apresentaram a média de $12,3 \pm 1,9$ mcg/l (4,9-28,9). Outros catorze pacientes do grupo Asma II (14/23) apresentaram valor médio de $22,5 \pm 7,7$ mcg/l (6,6-114,1). Houve diferença significativa entre as médias nos três grupos, quando empregado o teste de Kruskal-Wallis ($H = 13,9$, $p < 0,0009$). A distribuição individual dos valores de ECP está demonstrada na figura 2 e seus valores médios representados nos anexos.

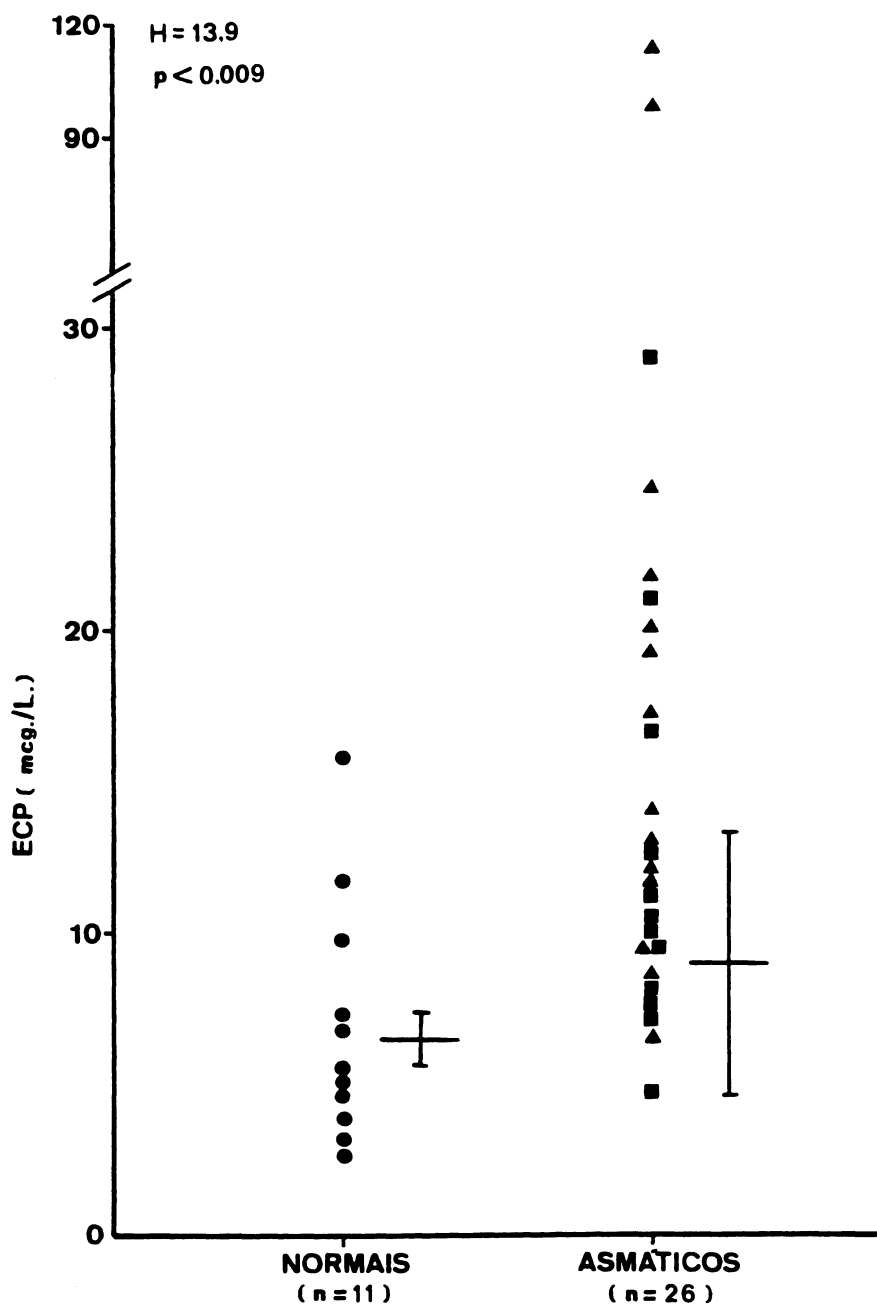


FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DA PROTEÍNA CATIONICA EOSINOFÍLICA (ECP) NOS INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES ASMÁTICOS

■ ASMA I ▲ ASMA II
 MÉDIA ± EPM

6 IgE TOTAL E ESPECÍFICA

Devido a grande amplitude dos valores da IgE total, foi utilizada a média geométrica. No grupo de indivíduos normais a média foi 42,8 UK/l (limites: 3,3-310), enquanto que nos pacientes do grupo Asma I foi 626,4 UK/l (29,9-2647) e nos pacientes do grupo Asma II, 1104,8 UK/l (93-3045). A distribuição individual destes valores pode ser observada na figura 3.

Quando reunidos os pacientes dos grupos Asma I e II encontramos a média geométrica de 846,6 UK/l. Houve diferença significativa entre as médias dos indivíduos normais e asmáticos. Não houve diferenças entre os grupos I e II embora a média no grupo Asma II fosse duas vezes maior que a do grupo Asma I (tabela VI).

No grupo de indivíduos normais encontramos dez sem antecedentes familiares de doenças atópicas (10/18) e oito com estes antecedentes (8/18). Observamos que a média geométrica da IgE total no primeiro grupo foi de 24,4 UK/l, enquanto que a média no segundo grupo foi de 166,3 UK/l. Houve diferenças significativas ($p < 0,01$) entre esses valores quando empregado o teste t de Student.

Anticorpos IgE específicos ao *D. pteronyssinus* não foram detectados no grupo de indivíduos normais. A média de IgE específica nos pacientes do grupo Asma I foi $37,4 \pm 8,9$ UK/l (limites: 0->100) e $73,8 \pm 7,2$ UK/l (0,9->100) nos pacientes do grupo Asma II. Quando reunidos os grupos I e II a média foi de $58,7 \pm 6,2$ UK/l. Houve diferença significativa entre os grupos (tabela VI). Em um paciente do grupo Asma I a IgE específica não foi determinada e em outro ela não foi detectada pelo método empregado. Como a IgE específica não era critério de inclusão, o paciente permaneceu no estudo.

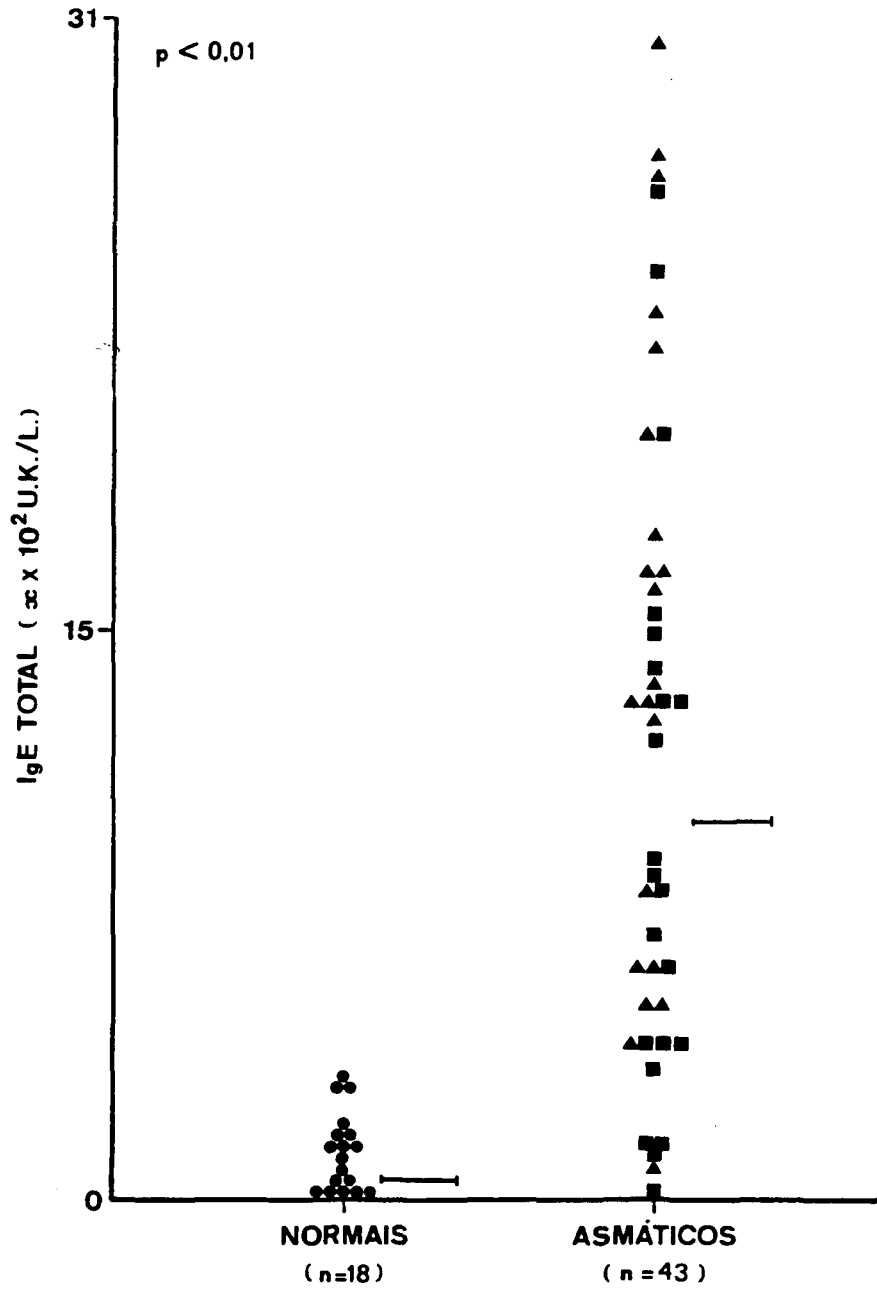


FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE IgE TOTAL NOS INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES ASMÁTICOS

■ ASMA I ▲ ASMAII
 MEDIANA

TABELA VI - NÍVEIS SÉRICOS DE IgE TOTAL E ESPECÍFICA PARA *D. pteronyssinus* NOS GRUPOS ESTUDADOS. VALORES DE IgE TOTAL EM MÉDIA GEOMÉTRICA E ESPECÍFICA EM MÉDIA ARITMÉTICA E MEDIANA

GRUPO	n	IgE (UK/l)	
		total	específica
NORMAL	18	42,8 b 53,1 # (3,3-310)	N.D.
ASMA I	20/19	626,4 a 882,0 # (29,9-2647)	37,4 a ± 8,9 29,0 # (0->100)
ASMA II	23	1104 a 1333,0 # (93-3045)	73,8 b ± 7,2 100,0 # (0,9->100)

()limites; N.D.: não detectável; # mediana;

Tukey: $p < 0,01$ quando letras diferentes.

N.S. quando letras iguais.

Houve também uma associação entre os níveis de IgE específica e a gravidade da asma. Encontramos quatro asmáticos do grupo I (24%) e treze asmáticos do grupo II (76%) com IgE > 100 UK/l, valor que representa níveis extremamente elevados do anticorpo no soro. Com a IgE < 100 UK/l, encontramos quinze pacientes do grupo Asma I (60%) e dez do grupo Asma II (40%). Houveram diferenças significativas quando empregado o Teste exato de Fisher ($p < 0,02$) (tabela VII).

TABELA VII - ASSOCIAÇÃO ENTRE "NÍVEIS EXTREMAMENTE ELEVADOS" DE IgE ESPECÍFICA E GRAVIDADE DA ASMA

GRUPO	IgE > 100 UK/l	IgE < 100 UK/l	TOTAL
ASMA I	4 (24%)	15 (60%)	19
ASMA II	13 (76%)	10 (40%)	23

Teste exato de Fisher: $p < 0,02$

7 CORRELAÇÕES

Analizamos as principais correlações entre as variáveis estudadas (VEF₁, DP₂₀, eosinófilos, eosinófilos hipodensos, ECP e IgE total e específica), pelo teste não-paramétrico de Spearman nos asmáticos. Os valores estão descritos nos anexos. As contagens de eosinófilos no sangue de asmáticos estão significativamente correlacionadas com o percentual de eosinófilos hipodensos ($r = 0,41$, $p < 0,005$) e com os níveis séricos de ECP ($r = 0,52$, $p < 0,001$).

Os eosinófilos hipodensos, por sua vez, estão correlacionados à ECP ($r = 0,54$, $p < 0,04$).

Há também uma correlação, porém fraca, entre eosinófilos e IgE total ($r = 0,38$, $p < 0,01$) mas não com a IgE específica.

Não houve correlação entre o VEF₁ e as demais variáveis analisadas. A DP₂₀ se correlaciona inversamente com a contagem de eosinófilos ($r = -0,48$, $p < 0,001$) e com os níveis de IgE total ($r = -0,43$, $p < 0,01$), indicando que quanto maior a eosinofilia e os níveis de IgE, maior a hiperreatividade brônquica.

Os níveis de IgE total têm correlação significativa com os níveis de IgE específica ($r = 0,65$, $p < 0,001$).

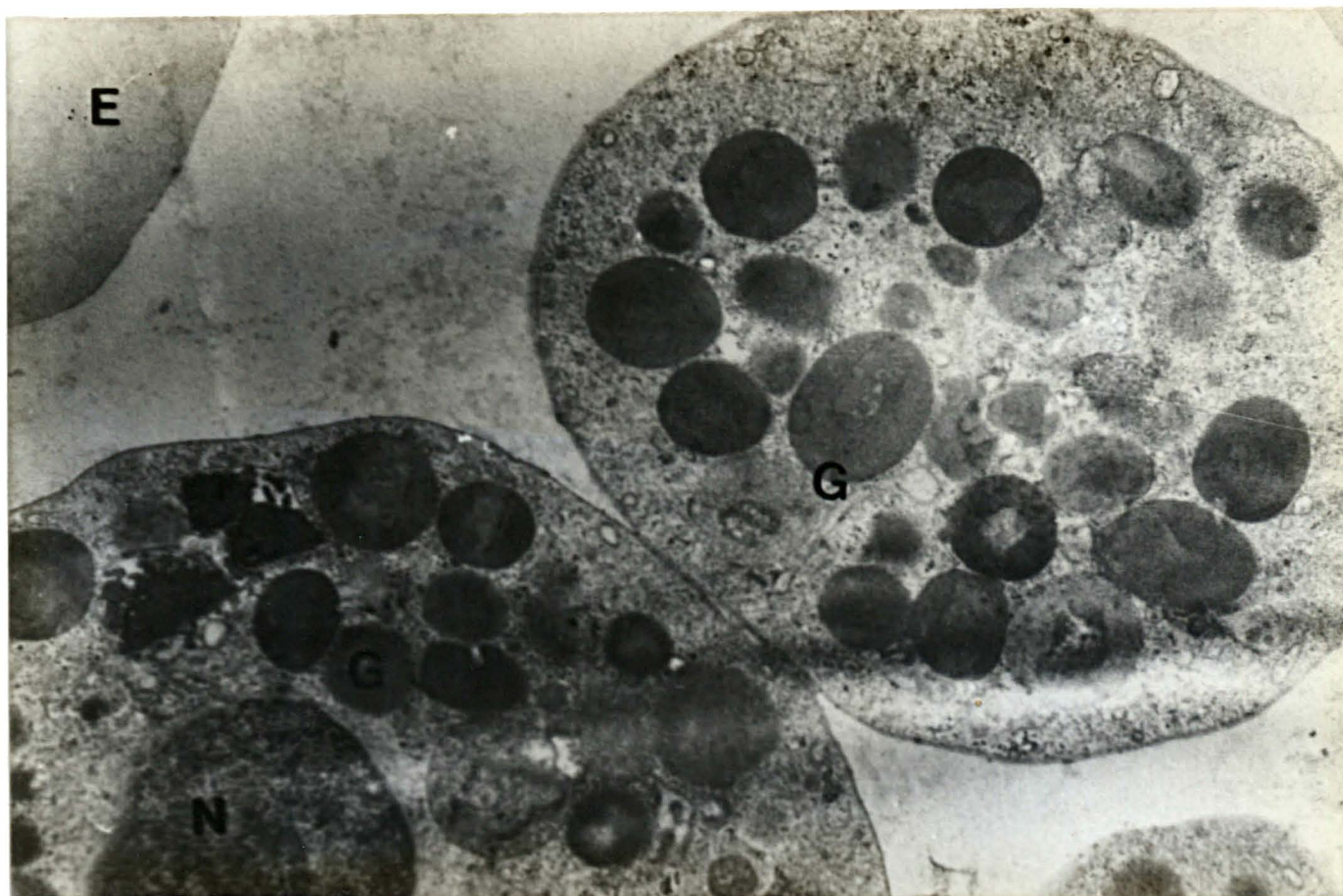
A avaliação das bandas autogeradas através do Percoll, demonstrou nos casos estudados em microscopia eletrônica, que houve a separação dos eosinófilos por gradientes de densidade. Na figura 4 observa-se as diferenças morfológicas entre os eosinófilos hipodensos e normodensos.

FIGURA 4 - COMPARAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA ENTRE EOSINÓFILOS HIPODENSOS E NORMODENSOS. AMPLIAÇÃO DE 23.000X.



A: Eosinófilo hipodenso (N: núcleo; G: grânulo; E: eritrócito).

FIGURA 4 - COMPARAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA ENTRE EOSINÓFILOS HIPODENSOS E NORMODENSOS. AMPLIAÇÃO DE 23.000X.



B: Eosinófilo normodenso (G: grânulo; N: núcleo).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas em cuja patogênese os eosinófilos desempenham papel destacado. A associação entre eosinofilia sangüínea e asma é conhecida há muito tempo. Seguiu-se a observação de eosinofilia nos tecidos pulmonares do asmático; mais tarde, a demonstração de citotoxicidade ao epitélio respiratório por mediadores químicos originados dos eosinófilos, que se acumulam no escarro, sangue e tecidos. Estabeleceu-se também a relação de eosinofilia com a fase tardia da reação alérgica na asma e o conhecimento dos fatores responsáveis pela produção, quimiotaxia, ativação e manutenção da vitalidade dos eosinófilos. A verificação de que os eosinófilos de baixa densidade exibem número maior de receptores para IgE e C₃b, maior consumo de oxigênio e citotoxicidade sugere que esta é a forma provavelmente ativada e de participação direta nos processos inflamatórios das vias aéreas dos asmáticos (CAPRON et al., 1984; CAPRON et al., 1986a, 1986b; SHULT et al., 1988; WELLER, 1994).

Do ponto de vista clínico, já se demonstrou haver relação entre a hiperreatividade brônquica, que é um reflexo da atividade inflamatória e eosinófilos de baixa densidade (KROUWELS et al., 1991).

No presente estudo, selecionamos 43 pacientes com asma atópica e 18 indivíduos não-atópicos, sem doença respiratória e sem parasitoses que servissem como controles normais. As amostras foram homogêneas e não diferiram entre si com respeito à idade, peso, altura e distribuição de sexos. Os critérios para inclusão e exclusão foram rigorosos para que estas e outras variáveis não interferissem nos resultados,

especialmente a presença de helmintíases que provocam eosinofilia e elevação dos níveis séricos de IgE (BUTTERWORTH et al., 1975, 1979; PARRILO e FAUCI, 1978; ROSÁRIO FILHO, 1980; ROSÁRIO FILHO et al., 1988b).

Para o diagnóstico de atopia, foi considerada a história familiar de doenças atópicas, a presença de rinite alérgica, reação cutânea imediata positiva aos antígenos do *D. pteronyssinus* e no sangue, a presença de anticorpos IgE específicos para o *D. pteronyssinus*, níveis elevados de IgE total e eosinofilia.

Os asmáticos foram divididos em dois grupos utilizando-se a classificação da asma pela gravidade, proposta por Aas. No grupo Asma I estavam os pacientes com crises de sibilância pouco frequentes, que melhoravam com broncodilatadores e apresentavam função pulmonar aparentemente normal. No grupo Asma II, os pacientes que apresentavam crises intensas e prolongadas, em geral necessitando corticóides e com função pulmonar alterada.

Observamos que o VEF₁ por ocasião da realização do exame para admissão ao estudo, estava significativamente reduzido no grupo Asma II se comparado ao grupo Asma I e ao grupo controle. Da mesma forma, o PFE acompanhava a redução do VEF₁, no grupo Asma II (tabela III).

Assim a classificação da asma pela gravidade como empregada aqui, está coerente com os resultados dos testes de função pulmonar para avaliação do grau de obstrução nas vias aéreas.

Não houve a correlação esperada entre as provas de função pulmonar e o número de eosinófilos ou porcentagens de eosinófilos hipodensos.

HORN et al. (1975) demonstraram que a função pulmonar era inversamente proporcional ao número de eosinófilos. KROUWELS et al. (1991) estudando crianças e adultos asmáticos, por provocação com alérgeno, demonstraram que havia relação inversa entre o VEF₁ e eosinófilos hipodensos em sangue periférico, na reação tardia da asma.

A padronização dos métodos para avaliação da hiperreatividade brônquica

permitiu comparações de vários estudos entre si. Quando estabeleceu-se que as reações à inalação de substâncias broncoconstritoras eram dose-dependentes, os pacientes podiam ser comparados entre si. Fatores inerentes ao método ou aos pacientes podem interferir na fidelidade e na reprodutibilidade dos resultados (COCKCROFT, 1985, 1987).

Empregamos uma técnica de provocação brônquica com a inalação de doses crescentes de metacolina através de um nebulizador De Vilbiss com nebulímetro 646 e máscara facial (CHATHAM et al., 1982). Esta técnica serve como triagem para avaliação da HRB e foi utilizada porque é mais simplificada e não necessita o dosímetro de Rosenthal.

CHATHAM et al. (1982) em um estudo com dez indivíduos normais e treze asmáticos, compararam esta técnica com o método clássico de provocação (CHAI, 1975) e encontraram excelente correlação ($r = 0,92$, $p < 0,001$). Foi observado também que o valor médio da DP₂₀, foi menor, quando empregada a técnica de triagem, isto é, menores doses de metacolina para atingir diminuição de 20% no VEF₁. Não houve também resultados falso-positivos ou negativos quando comparado ao método clássico.

Outra técnica padronizada com o mesmo nebulímetro mas utilizando um bocal e a respiração em volume corrente (COCKCROFT, 1985, 1987) pode ser empregada para provocação brônquica e tem sido utilizada em nosso meio (MALLOZI et al., 1990; RIBEIRO et al., 1992).

Observamos associação entre o grau de HRB e a gravidade da asma. As médias da DP₂₀ foram significativamente inferiores à medida em que aumentava a gravidade da asma. Entretanto, a frequência da HRB à metacolina não estava associada significativamente à gravidade da asma (tabela IV).

Houve também correlação nos asmáticos, entre DP₂₀ e IgE total, apesar dos exames terem sido realizados em épocas diferentes.

Estas informações, junto à avaliação clínica e aos resultados do VEF₁, sugerem que a classificação adotada para a gravidade da doença foi satisfatória.

Estudos demonstram que a HRB está relacionada à atopia mas pode estar presente em outras doenças não-alérgicas (COCKCROFT et al., 1979; SIBBALD et al., 1980; SEARS et al., 1991).

Os pacientes com asma eram alérgicos ao *D. pteronyssinus* com teste cutâneo de reação imediata positivo aos antígenos deste ácaro e níveis séricos de anticorpos IgE específicos considerados altos na maioria dos casos. Houve grande dispersão dos valores de IgE total e específica mas mesmo assim houve correlação positiva entre ambas, sugerindo a dependência dos níveis de IgE total pela presença de anticorpos específicos ao *D. pteronyssinus*.

Os valores de IgE total estavam elevados em 95% (19/20) dos pacientes do grupo Asma I e 95% (22/23) dos pacientes do grupo Asma II, quando comparados com o limite superior de normalidade para o nosso estudo. Há uma tendência ao aumento dos níveis séricos de IgE total com a maior gravidade da asma. A média geométrica no grupo Asma II foi duas vezes maior que a média no grupo Asma I, embora não fossem significativas as diferenças.

Proporções semelhantes foram observadas com os valores de IgE específica e alterações significativas entre os grupos I e II foram encontradas.

O conceito de asma extrínseca (alérgica) e intrínseca (não-alérgica) como duas formas distintas da doença tem sido reavaliado. Um estudo em que o diagnóstico de asma foi baseado em questionário não validado por critérios objetivos, demonstrou que a prevalência de asma estava relacionada aos níveis de IgE corrigidos para a idade e sexo (BURROWS et al., 1989). A asma era mais freqüente nos indivíduos com níveis mais elevados de IgE total, em relação direta. Estes achados foram interpretados como indicando que a asma tem provável base na reação alérgica mesmo em pessoas não-atópicas com testes cutâneos negativos.

Em crianças neozelandesas a prevalência de asma está fortemente relacionada aos níveis séricos de IgE total. Nenhum caso de asma foi identificado em crianças com IgE < 32 UK/l, ao passo que 36% dos que tinham níveis > 1000 UK/l tinham asma.

Havia correlação entre hiperreatividade das vias aéreas à metacolina com níveis séricos de IgE, até quando excluía-se as crianças atópicas (SEARS et al., 1991). Outro estudo com crianças dinamarquesas normais, entre 7 e 16 anos, obteve a média geométrica de 18 UK/l para a IgE total e valor máximo de 330 UK/l (BACKER et al., 1992).

Em nosso estudo, quando separamos os indivíduos normais, não-atópicos e não-parasitados, conforme tivessem ou não, história familiar de doença atópica, verificamos que a média de IgE total foi significativamente mais elevada quando há antecedentes de atopia em familiares. A média geométrica de 24,4 UK/l nos normais sem história de atopia nos familiares é próxima à observada em outros estudos (KJELLMAN et al., 1976; SEARS et al., 1991; BACKER et al., 1992).

Portanto, em estudos para determinação de níveis normais de IgE no soro, há necessidade além de controlar outras variáveis (sexo, idade, tabagismo, parasitoses, etc.) de valorizar os antecedentes familiares de atopia.

A contagem de eosinófilos em sangue periférico, a determinação da porcentagem de eosinófilos hipodensos e a determinação dos níveis de proteína catiônica eosinofílica (ECP) foram realizadas na expectativa de se obter uma relação entre eosinofilia, aumento de eosinófilos hipodensos e da ECP em consequência da liberação deste mediador. Estas relações levaram os autores a hipóteses já mencionadas sobre a degranulação do eosinófilo (FUKUDA e MAKINO, 1989; KAUFFMAN et al., 1991; KROUWELS et al., 1991).

A escolha da contagem de eosinófilos através do esfregaço em lâmina, foi baseada nos trabalhos que comparam esta técnica com a contagem absoluta pelo método de Randolf. Os autores comparando as duas técnicas, demonstraram ser a técnica pelo esfregaço, mais rápida, menos laboriosa e sobretudo sem diferenças significativas entre os resultados (CHURCH e RICHARDS, 1978; ROSÁRIO FILHO, 1988a).

As médias do número de eosinófilos em sangue periférico foi significativamente maior nos asmáticos do que nos normais, porém não houve diferenças entre os grupos Asma I e II (tabela V). A média de eosinófilos nos normais foi compatível com o da

literatura que estabeleceu 0 a 350 eos./mcl como valor de referência (GUEDES, 1986). Não avaliamos a diferença entre os sexos devido ao pequeno número da amostra. CUNNINGHAM (1975) encontrou diferenças significativas nas contagens, entre indivíduos de idades e sexos diferentes. Em 700 indivíduos de zero a doze anos, a média foi de 259 ± 11 eos./mcl para o sexo masculino e 218 ± 9 eos./mcl para o sexo feminino. A maior elevação ocorreu entre seis e dez anos mas sempre com valores inferiores a 350 eos./mcl.

Com base nos dados apresentados, podemos sugerir que no nosso estudo as diferenças de idade não foram fatores que pudessem alterar significativamente os resultados.

Nos asmáticos, observamos valores médios de eosinófilos quase duas vezes maiores que o dos normais. Apesar de não haverem diferenças entre os pacientes dos grupos Asma I e II, observamos que no grupo Asma I, oito pacientes (8/20) e no grupo Asma II, dois pacientes (2/23) apresentaram eosinófilos abaixo de 399/mcl, considerado o limite superior de normalidade para este estudo.

Os asmáticos apresentaram número elevado de basófilos no sangue quando comparados ao de normais mas não houve correlação com as demais variáveis. Valores acima de 50 células/mcl em sangue, freqüentemente estão associados a doenças alérgicas e outras como leucemias, colites, etc. (SHELLEY e PARNES, 1965).

Os eosinófilos hipodensos foram obtidos através da técnica de sedimentação com Percoll, uma técnica laboriosa, necessitando diversos equipamentos e reagentes. Não havia possibilidade de estocagem do material, uma vez que se trabalhou com células vivas. No estudo 98% das células apresentavam boa vitalidade, testada pelo uso do corante azul de tripano. A autogeração dos gradientes de Percoll por ultracentrífuga e o uso de marcadores coloridos de densidade nos deram maior segurança para a identificação das bandas de células.

Apesar da alta pureza obtida na suspensão dos eosinófilos (90%) pelas técnicas com Metrizamida ou Percoll, atualmente a utilização de anticorpos monoclonais 3G8

(anti-CD16) para depleção dos neutrófilos e de separadores magnéticos ("Dynabeads"), consegue-se uma maior pureza (99%) nas amostras de pacientes com eosinofilia e em indivíduos normais (95%) (LUCEY et al., 1989).

HANSEL et al. (1991), observaram que a separação pela metrizamida atingia maior pureza em indivíduos que apresentavam no sangue periférico, valores acima de 2% e pela técnica com Percoll, 4%. A técnica que utiliza anticorpos monoclonais consegue maior pureza na separação dos eosinófilos, independentemente de seu número no sangue periférico.

A porcentagem média de eosinófilos hipodensos (EH) nos normais foi compatível com os dados de literatura. FUKUDA et al. (1985) encontraram valores inferiores a 18%, enquanto outros autores obtiveram valores médios de 10% em seus grupos-controles (FRICK et al., 1988,1989; MOENS et al., 1992).

Nos asmáticos havia uma quantidade três vezes maior de EH em relação aos normais. Não houve diferença significativa entre os grupos Asma I e II. Este fato poderia ser explicado porque na amostra estavam pacientes estáveis clinicamente.

FUKUDA et al. (1985) estudaram dez asmáticos, dez indivíduos normais e dois com hipereosinofilia e encontraram médias de 35%, 10% e 95% de EH respectivamente. Encontraram correlação entre eosinófilos hipodensos, eosinófilos periféricos e a proteína alcalina principal (MBP).

SHULT et al. (1988) estudando 19 asmáticos adultos, encontraram 41% de EH e uma correlação destes com eosinófilos periféricos ($r = 0,58$, $p < 0,001$).

KLOPROGGE et al. (1989) utilizando eosinófilos de indivíduos normais e asmáticos, estimulados "in vitro" com PAF e outras substâncias, observaram aumento das porcentagens de EH em até 76% o que sugere que os eosinófilos quando ativados, tornam-se hipodensos.

A proteína catiônica eosinofílica (ECP) é liberada do eosinófilo ativado, promove lesão do epitélio respiratório, altera a cascata da coagulação, aumentando o fator XII e a fibrinólise (CAPRON et al., 1989). No estudo dosamos os níveis de ECP, comparamos os

resultados e encontramos diferença significativa entre os grupos estudados.

SUGAI et al. (1992) estudando crianças com asma, encontraram a média de $23,7 \pm 21,4$ mcg/l nos asmáticos, $5,8 \pm 2,3$ mcg/l nos normais e também como em nosso estudo uma grande dispersão de valores. Os autores chamam a atenção para o cuidado com o tempo deixado para a retração do coágulo que não deve ser superior a 60 ± 10 minutos, pois a ECP é liberada durante este período, resultando em alteração dos resultados.

ZIMMERMAN (1993) avaliou inicialmente que os níveis de ECP poderiam ser maiores em asmáticos sintomáticos do que em asmáticos sem sintomas clínicos. Encontrou também uma relação inversa entre valores de VEF_1 e ECP. Estes pacientes, em um total de 21, apresentaram diminuição importante dos níveis de ECP após três meses de tratamento com corticóide inalado. Estes dados demonstram a estreita relação da ECP com a atividade inflamatória nas vias aéreas e os sintomas clínicos. O autor preconiza, além disso, que níveis de ECP acima de 40 mcg/l no soro, sugerem asma moderada ou grave.

BOUSQUET et al. (1990a) estudando 43 asmáticos adultos, por lavado broncoalveolar; biópsia brônquica; eosinófilos periféricos e provas de função pulmonar, demonstraram uma relação entre o grau de inflamação nas vias aéreas e os níveis de ECP e eosinófilos no lavado broncoalveolar. Estas variáveis também se correlacionavam com o número de eosinófilos no sangue periférico e com a gravidade da asma, avaliada pela utilização do escore proposto por Aas.

Observamos correlação positiva entre eosinofilia e a presença da ECP no soro, um mediador químico de ação inflamatória. Quanto maior a contagem de eosinófilos no sangue, maior a concentração de células de baixa densidade e maior a concentração de ECP no soro. Os estudos de literatura sugerem que na asma atópica, a produção de citocinas (IL-3, IL-5 e GM-CSF) leva a liberação de eosinófilos pela medula óssea, ativação destas células e manutenção da sua vitalidade (BASTEN e BEESON, 1970; MANIATIS et al., 1987; WARREN e MOORE, 1988; FREW e KAY, 1990; WELLER, 1994).

Os níveis de ECP estão mais elevados na doença mais grave (figura 2) e a hiperreatividade à metacolina em nossos pacientes se associava diretamente à contagem de eosinófilos. Nos restaria mostrar que se os níveis de ECP poderiam estar relacionados à hiperreatividade das vias aéreas. O número pequeno de asmáticos graves submetidos à provocação com metacolina por não apresentarem condições para o teste ($VEF_1 > 80\%$ do esperado) e o número limitado de amostras de ECP, não permitiram avaliar a HRB em relação à ECP.

A ECP é um dos marcadores para avaliação do processo inflamatório das vias aéreas e poderia de maneira rápida e segura, além de monitorar a inflamação, avaliar os resultados terapêuticos empregados no tratamento da asma (MIDANDER, 1993; BOUSQUET et al., 1990a; VENGE, 1993a).

Acreditamos que com este estudo, pudemos avaliar alguns aspectos clínicos e laboratoriais da reação inflamatória nas vias aéreas, onde o eosinófilo hipodenso e seus mediadores têm cada vez mais, um destacado papel. Foi possível demonstrar a interdependência da reação inflamatória com a hiperreatividade brônquica e a reação alérgica e também suas relações com a gravidade da asma.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- 1) A hiperreatividade brônquica à metacolina é mais freqüente no asmático atópico e se acentua com a gravidade da asma.
- 2) Ocorre basofilia e eosinofilia no sangue periférico de asmáticos atópicos.
- 3) O percentual de eosinófilos de baixa densidade é maior nos asmáticos atópicos.
- 4) Os níveis séricos da proteína catiônica eosinofílica (ECP) são significativamente mais elevados nos asmáticos atópicos e têm relação com a gravidade da doença.
- 5) Há uma correlação significativa entre o número de eosinófilos no sangue, o percentual de eosinófilos hipodensos e os níveis séricos de ECP.
- 6) O grau de atopia, representado por níveis de IgE específica ao *D. pteronyssinus*, determina maior gravidade na asma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.T.S. Standardization of spirometry 1987 - update. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v.136, p. 1285-1298, 1987.
- AAS, K. Heterogeneity of bronchial asthma subpopulations, or different stages of disease? **Allergy**, New York, v.36, p. 3-14, 1981.
- ACKERMAN, S.J.; KEPHART, G.M.; HABERMANN, T.M.; GREIPP, P.R.; GLEICH, G.J. Localization of eosinophil granule major basic protein in human basophils. **J. Exp. Med.**, New York, v. 158, p. 946-961, 1983.
- ADINOFF, A. D.; SCHLOSBERG, R.T.; STRUNK, R.C., Methacholine inhalation challenge in young children. Results of testing and follow-up. **Ann. Allergy**, Blomington, v. 61, p. 282-286, 1988.
- ALAM, R.; STAFFORD, S.; FORSYTHE, P.; MARRISON, R.; LETT-BROWW, M.A.; GRANT, A. RANTES is a chemotactic and activating factor for eosinophils. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 91, p. 314, 1993.
- BACKER, V.; ULRİK, C.S.; WENDELBOE, D.; BACH-MORTENSEN, N.; HANSEN, K.K.; LAURSEN, E. M.; DIRKSEN, A. Distribution of serum IgE in children and adolescents aged 7 to 16 years in Copenhagen, in relation to factors of importance. **Allergy**, Copenhagen, v.47, p. 484-489, 1992.
- BAGGIOLINI, M.; WAIZ, A.; KUNKEL, S. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 84, p. 1045-1055, 1989.

- BARKER, R.L.; GLEICH, G.J.; PEASE, L.R. Acidic precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA. *J. Exp. Med.*, New York, v. 168, p. 1493-1504, 1988.
- BASS, D.A.; GROVER, W.H.; LEWIS, J.C.; SZEJDA, P.; DECHATELET, L.R. Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 66, p. 1265-1273, 1980.
- BASTEN, A.; BEESON, P.B. Mechanism of eosinophilia. *J. Exp. Med.*, New York, v. 131, p. 1288-1305, 1970.
- BIERMAN, C.W.; SHAPIRO, G.G. Clinical expression of bronchial hyperreactivity in children. *Clin. Rev. Allergy*, Clifton, v. 7, p. 301-320, 1989.
- BISGAARD, H.; GRONBORG, H.; MYGIND, N.; DAHL, R.; WINQVIST, N.; VENGE, P. Allergen-Induced increase of eosinophil cationic protein in nasal lavage fluid: effect of the glucocorticoid budesonide. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 85, p. 891-895, 1990.
- BOUSQUET, J.; CHANEL, P.; LACOSTE, J.Y.; BARNEON, G. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 323, p. 1033-1039, 1990a.
- BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; CHANAL, I.; MICHEL, F. B. Comparison between RAST and Pharmacia CAP System: a new automated specific IgE assay. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v.85, p. 1039-1043, 1990b.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Oslo, v. 21 (suppl), p. 77, 1968.
- BRAMAN, S.S.; CORRAO, W.M., Bronchoprovocation testing. *Clin. Chest Med.*, Philadelphia, v. 10, p. 163-176, 1989.
- BRITTON, J.; TATTERSFIELD, A.E. Does measurement of bronchial hyperreactivity help the clinical diagnosis of asthma? *Eur. J. Respir. Dis.*, Copenhagen, v. 68, p. 233-288, 1986.

- BRUIJNZEEL, P. L. B.; VERHAGEN, J. Lipid metabolism by eosinophils. In: Morley, J; Colditz, I. **Eosinophils in asthma**, Academic Press Limited, London, p. 69-85, 1989.
- BUCHI, D. F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrofages. **Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v.24, p. 135-141, 1992.
- BUCKLEY, R.H.; BECKER, G. Abnormalities in the regulation of human IgE synthesis. **Immunol. Rev.**, New York, v. 41, p. 288-298, 1978.
- BURNEY, P.G.T.; BRITTON, J.R.; CHINN, S.; TATTERSFIELD, A.E.; PAPACOSTA, A.O.; KELSON, M.C.; ANDERSON, F.; CORFIELD, D.R. Descriptive epidemiology of bronchial reactivity in an adult population; results from a community study. **Thorax**, London, v. 42, p. 38-44, 1987.
- BURROWS, B.; MARTINEZ, F. D.; HALONEN, M.; BARBEE, R. A.; CLINE, M. G. Association of asthma with serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 320, p.271-277, 1989.
- BUSSE, W.W.; SEDGWICK, J.B. Eosinophils in asthma. **Ann. Allergy**, Bloomington, v. 68, p. 286-290, 1992.
- BUTTERWORTH, A.E.; STURROCK, R.F.; HOUBA, V.; MAHMOUD, A.A.F.; SHER, A.; RESS, P.H. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. **Nature**, London, v. 256, p. 727, 1975.
- BUTTERWORTH, A.E.; WASSOM, D.L.; GLEICH, G.L.; LOEGERING, D.A.; DAVID, J.R. Damage to schistosomula of *schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 122 p. 221-229, 1979.
- CAPRON, A.; DESSAINT, J.P.; CAPRON, M.; JOSEPH, M.; AMEISEN, J.C.; TONNEL, A.B. From parasites to allergy the second receptor for IgE. (FCE RII). **Immunology Today**, Cambridge, v.7, p. 15-18, 1986a.

- CAPRON, M.; JOVAULT, T.; PRIN, L.; JOSEPH, M.; AMEISEN, J.C.; BUTTERWORTH, A.E.; PAPIN, J.P.; KUSNIERZ, J.P.; CAPRON, A. Functional study of a monoclonal antibody to IgE FC receptor (FCE R2) of eosinophils, platelets and macrophages. *J. Exp. Med.*, New York, v. 164, p. 72-89, 1986b.
- CAPRON, M.; LEPREVOST, C.; PRIN, L.; TOMASSANI, M.; TORPIER, G.; MACDONALD, S.; CAPRON, A. Immunoglobulin mediated activation of eosinophils. In: Morley, J.; Colditz, I. **Eosinophils in asthma**, Academic Press Limited, London, p. 49-60, 1989.
- CAPRON, M.; SPIEGELBERG, H.L.; PRIN, L.; BENNICH, H.; BUTTERWORTH, A.E.; PIERCE, R.J.; QUAISSI, M.A.; CAPRON, A. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 132, p. 462-468, 1984.
- CHAI, H. Bronchial challenges. *Clin. Rev. Allergy*. Clifton, v. 6, p. 231-258, 1988.
- CHATHAM, M.; BLEECKER, E. R.; NORMAN, P.; SMITH, P. L.; MASON, P. Screening test for airways reactivity. *Chest*, Illinois, v. 82, p. 15-18, 1982.
- CHURCH, J. A.; RICHARDS, W. Routine laboratory determinations in pediatric allergic disease. *Ann. Allergy*, Bloomington, v. 41, p. 136-139, 1978.
- CLOUGH, J.B.; HOLGATE, S.T. The natural history of bronchial hyperresponsiveness. *Clin. Rev. Allergy*, Clifton, v. 7, p. 257-278, 1989.
- COCKCROFT, D. W. Bronchial inhalation tests I. Measurement of nonallergic bronchial responsiveness. *Ann. Allergy*, Illinois, v. 55, p. 527-537, 1985.
- COCKCROFT, D. W. Bronchial inhalation tests II. Measurement of allergic (and occupational) bronchial responsiveness. *Ann. Allergy*, Bloomington, v. 59, p. 89-99, 1987.
- COCKCROFT, D.W.; BERSCHIED, B.A. Standardization of inhalation provocation tests: dose VS concentration of histamine. *Chest*, Illinois, v. 82, p. 752-755, 1982.

- COCKCROFT, D. W.; RUFFIN, R.E.; FRITH, P.A. Determinants of allergen induced asthma: dose of allergen, circulating IgE antibody concentration and bronchial responsiveness to inhaled histamine. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v. 120, p. 1053-1058, 1979.
- COOKSON, W.O.C.M.; CRADDOCK, C.F.; BENSON, M.K.; DURHAM, S.R. Falls in peripheral eosinophil counts parallel the late asthmatic response. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v. 139, p. 458-462, 1989.
- CUNNINGHAM, A.S. Eosinophil counts: Age and sex differences. **J. Pediatrics**, St. Louis, v.87, p.426-427, 1975.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. Eosinophil counts by counting chamber methods. In: **Practical haematology**, Churchill Livingstone, London, p. 51-53, 1975.
- DE SIMONE, C.; DONELLI, G.; MELI, D.; ROSATI, F.; SORICE, F. Human eosinophils and parasitic diseases II. Characterization of two cell fractions isolated at different densities. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 48, p. 249, 1982.
- DRAZEN, J.M.; HIRSCHMAN, C.; MACKLEM, P.T.; PAUWELS, R.; PERMUTT, S.; PERSSON, C. Physiology. In : HOLGATE, S.T. **The role of inflammatory processes in airway hyperresponsiveness**, Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 108-150, 1989.
- DURHAM, S. R.; KAY, A. B. Eosinophils bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 15, p. 411-418, 1985.
- DURHAM, S.R.; LOEGERING, D.A.; DUNNETTE, S.; GLEICH, G.J.; KAY, B. Blood eosinophils and eosinophil derived proteins in allergic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 84, p. 931-936, 1989.
- EBISAWA, M.; YAMADA, T.; KLUNK, D.; BICKEL, C.; LIU, M.; BOCHNER, B.S.; SCHLEIMER, R.P. Regulation of eosinophil and neutrophil transendothelial migration by cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 91, p. 313, 1993.

- EMPEY, D.W.; LAITINEN, L.A.; JACOBS, L.; GOLD, W.M.; NADEL, J.A. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection. *Am. Rev. Respir. Dis.*, New York, v. 113, p. 131-139, 1976.
- ERGER, R.A.; CASALE, T.B. IL-8 induces eosinophil migration through endothelial and epithelial barriers. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 91, p. 312, 1993.
- FRANKLIN, W. Treatment of severe asthma. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 290, p. 1469-1473, 1974.
- FREDENS, K.; DAHL, R.; VENGE, P. The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 70, p. 361-366, 1982.
- FREW, A.J.; KAY, A.B. Eosinophils and T-lymphocytes in late phase allergic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 85, p. 535-539, 1990.
- FRICK, O.L. Effect of respiratory and other virus infections on IgE immunoregulation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 78, p. 1013-1018, 1986.
- FRICK, W.E.; SEDGWICK, J.B.; BUSSE, W.W. Hypodense eosinophils in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 82, p. 119-125, 1988.
- FRICK, O.L.; GERMAN, D.F.; MILLS, J. Development of allergy in children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 63, p. 228-241, 1979.
- FRICK, W.E.; SEDGWICK, J.B.; BUSSE, W.W. The appearance of hypodense eosinophils in antigen-dependent late phase asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, New York, v. 139, p. 1401-1406, 1989.
- FRIGAS, E.; GLEICH, G.J. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 77, p. 527-537, 1986.
- FRIGAS, E.; LOEGERING, D.A.; SOLLEY, G.O.; FARROW, G.M.; GLEICH, G.L. Elevated levels of eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.*, Rochester, v. 56, p. 345-353, 1981.

- FRIGAS, E. LOEGERING, D.A.; GLEICH, G.J. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 42, p. 35-43, 1980.
- FUKUDA, T.; GLEICH, G.J. Heterogeneity of human eosinophils. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 83, p. 369-373, 1989.
- FUKUDA, T.; DUNNETTE, S.L.; REED, C.E.; ACKERMAN, S.J.; PETERS, M.S.; GLEICH, G.J. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v. 132, p. 981-985, 1985.
- FUKUDA, T.; MAKINO, S. Eosinophil heterogeneity. In: MORLEY, J.; COLDITZ, I. **Eosinophils in asthma**, Academic Press Limited, London, p. 125-140, 1989.
- GARTNER, I. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coat silica gel (Percoll). **Immunology**, Oxford, v. 40, p. 133-136, 1980.
- GLEICH, G.J. The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 85, p. 422-433, 1990.
- GLEICH, G.J.; FLAVAHAN, N.A.; FUJISAWA, T.; VANHOUTTE, P.M. The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: A model for bronchial hyperreactivity, **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 81, p. 776-781, 1988.
- GLEICH, G.J.; FRIGAS, E.; LOEGERING, D.A.; WASSON, D.L.; STEINMULLER, D. Cytotoxic properties of eosinophil major basic protein. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 123, p. 2925, 1979.
- GLEICH, G.J.; LOEGERING, D.A.; MALDONADO, J.E. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules, **J. Exp. Med.**, New York, v. 137, p. 1459-1471, 1973.
- GLEICH, G.J.; LOEGERING, D.A.; MANN, K.G.; MALDONADO, J.E. Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 57, p. 633-640, 1976.

- GODFREY, S.; KONIG, P. Exercise-induced bronchial lability in monozygotic and dizygotic twins. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 54, p. 280-287, 1974.
- GOMES, F. P. **Estatística experimental**, Livraria Nobel S.A., Piracicaba, p. 18, 1987.
- GRIFFIN, E.; HAKANSSON, L.; FORMGREN, H.; JORGENSEN, K.; PETERSON, C.; VENGE, P., Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and whith eosinophilia, **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 87, p. 548-571, 1991.
- GUEDES, D.M. Pulmonary eosinophilia. **J. Royal Col. Phys. London**, London, v. 20, p. 139-145, 1986.
- GURWITZ, D.; MINDORFF, C.; LEVISON, H. Increased incidence of bronchial reactivity in children with a history of bronchiolitis. **J. Pediatrics**, St. Louis, v. 98, p. 551-555, 1981.
- HAKANSSON, L.; CARLSON, M.; STALENHEIM, G.; VENGE, P. Migratory responses of eosinophil and neutrophil granulocytes from patients with asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 85, p. 743-750, 1990.
- HANSEL, T.T.; DEVRIES, I.M.; IFF, T.; RIHS, S.; WANDZILAK, M.; BETZ, S.; BLASER, K.; WALKER, C. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 145, p. 105-110, 1991.
- HASTIE, A.T.; LOEGERING, D.A.; GLEICH, G.J.; KUEPPERS, F. The effect of purified human eosinophil major basic protein on mamalian ciliary activity. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v. 135, p. 848-853, 1987.
- HENDERSON, W.R.; HARLEY, J.B.; FAUCI, A.S. Arachidonic acid metabolism in normal and hypereosinophilic syndrome human eosinophils generation of leucotrienes B₄, C₄, D₄ and 15 lipoxygenase products. **Immunology**, Oxford, v. 51, p.679-686, 1980.

- HOLGATE, S.T.; KAY, A.B. Mast cell mediators and asthma. **Clin. Allergy**, London, v. 15, p. 221-234, 1985.
- HONSINGER, R.W.J.; SILVERSTEIN, D.; VAN ARSDEL, P.P.J. The eosinophil and allergy: Why? **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 49, p. 142-155, 1972.
- HORN, M.E.C.; BRAIN, E.A.; GREGG, I.; INGLIS, J.M.; YAALLAND, S.L.; TAYLOR, P. Respiratory viral infection and Wheezy bronchitis in childhood. **Thorax**, London, v. 34, p. 23-28, 1979.
- HORN, B.R.; ROBIN, E.D.; THEODORE, J.; VANKESSEL, A. Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 292, p. 1152-1155, 1975a.
- HUBSCHER, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions I. EDI - An eosinophil derived inhibitor of histamine release. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 144, p. 1379-1388, 1975a.
- HUBSCHER, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions II. Realease of prostaglandins from human eosinophil leukocytes. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 144, p. 1389-1393, 1975b.
- INTERNATIONAL CONSENSUS REPORT ON DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF ASTHMA. U.S. Department of Health and Human Services, U.S.A., 1992.
- IYER, M.; KUNA, P.; RUCINSKI, D.; KAPLAN, A. The chemokines RANTES, MCAF and IP10 activate eosinophils to release E.C.P. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 91, p. 314, 1993.
- JENKINS, C.R.; BRESLIN, A.B.X. Upper respiratory tract infections and airway reactivity in normal and asthmatic subjects. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v. 130, p. 879-883, 1984.

- JOHNSTON, I.D.A.; BLAND, J.M.; INGRAM, D.; ANDERSON, H.R.; WARNER, J.O.; LAMBERT, H.P. Effect of whooping cough in infancy on subsequent lung function and bronchial reactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, New York, v. 134, p. 270-275, 1986.
- JOSEPHS, L.K.; GREGG, I.; BAIN, D.J.G.; HOLGATE, S.T. A longitudinal study of non-specific bronchial responsiveness in asthma. *Thorax*, London, v. 42, p. 711, 1987.
- KAMEYOSHI, Y.; DORSCHENER, A.; MALLET, A.I.; CRISTOPHERS, E.; SCHRODER, J.M. Cytokine rantes released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J. Exp. Med.*, New York, v. 176, p. 587-591, 1992.
- KAUFFMAN, H.F.; BERENDS, C.; DIJKHUIZEN, B.; DE MONCHY, J.G.R.; GERRITSEN, J. Hypodense eosinophils and neutrophils in asthma? *Am. Rev. Respir. Dis.*, New York, v. 143, p. 1745, 1991.
- KHALIFE, J.; CAPRON, M.; CESBRON, J.Y.; TAI, P.C.; TAELEMAN, H.; PRIN, L.; CAPRON, A. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 137, p. 1659-1664, 1985.
- KJELLMAN, N. I.; JOHANSSON, S. G. O.; ROTH, A. Serum IgE levels in healthy children quantified by a sandwich technique (PRIST). *Clin. Allergy*, Oxford, v.6, p. 51-59, 1976.
- KLOPROGGE, E.; LEEUW, A.J.; MONCHY, J.G.R.; KAUFFMANN, H.F. Hypodense eosinophilic granulocytes in normal individuals and patients with asthma: Generation of hypodense cell populations in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 83, p. 393-400, 1989.
- KROUWELS, F.H.; KERSTENS, L.C.M.; VAN DER MAAREL, H.W.M.; DEGENHART, H.J.; NEIJENS, H.J. Density of eosinophils reflects activity of disease in allergic asthmatic children. *Academic Medical Center*, Amsterdam, Netherlands, 1991.
- LAITINEN, A.; PARTANEN, M.; HERVONEN, A.; LAITINEN, L.A., Electron microscopic study on the innervation of the human lower respiratory tract: evidence of adrenergic nerves. *Eur. J. Resp. Dis.*, Copenhagen, v. 67, p. 209-215, 1985.

- LEE, T. C.; LENIHAN, D.J.; MALONE, B.; RODDOY, L.L.; WASSERMAN, S.I. Increased biosynthesis of platelet activating factor in activated human eosinophils. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 259, p. 5526-5530, 1984.
- LOWELL, F.C. Clinical aspects of eosinophilia in atopic disease. **Jama**, Chicago, v. 202, p. 875-878, 1967.
- LOWHAGEN, O.; RAK, S. Modification of bronchial hyperreactivity after treatment with sodium cromoglycate during pollen season. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 75, p. 460-467, 1985.
- LUCEY, D.; DORSKY, D.I.; NICHOLSON-WELLER, A.; WELLER, P.F. Human eosinophils express CD 4 protein and bind HIV 1 gp 120. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 327-332, 1989.
- LUNDGREN, J.D.; DAVEY, R.T.; LUNDGREN, B.; MULLOL, J.; MARON, Z.; LOGUN, C.; BARANIUK, J.; KALINER, M.A.; SHELFHAMER, J.H. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 87, p. 689-698, 1991.
- MALLOZI, M.C.; SOLÉ, D.; NASPITZ, C.K. Avaliação da H.R.B. através de broncoprovocação com metacolina. **J. Pneumologia**, São Paulo, v. 16 (sup.1), p. 4, 1990.
- MANIATIS, T.; GOODBURN, S.; FISHER, J.A. Lymphocytes-T. **Science**, Washington, v. 236, p. 1237-1245, 1987.
- MATSSON, P.; AHLSTEDT, S.; ENANDER, I.; PETERSON, C.G. B.; VENGE, P. Measurement of specific markers in the monitoring of the bronchial inflammation in asthma. In: PIPER, P.J.; KRELL, R.D. **Advances in the understanding and treatment of asthma**, Clearance Center Inc., New York, p. 383-387, 1990.
- MIDANDER, J. Clinical documentation of inflammation markers in asthma. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 23, p. 13-19, 1993.

- MOENS, M. M.; DE CLERK, L. S.; BRIDTS, C.H.; VAN BEVER, H. P.; STEVENS, W. J. Hypodense eosinophils (HE) in asthmatic children and adults, compared to controls. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 89, p.280, 1992.
- MOK, J.Y.Q.; SIMPSON, H. Symptoms of atopy, and bronchial reactivity after lower respiratory infection in infancy. **Arch. Dis. Child**, London, v. 59, p. 299-305, 1984.
- MONCHY, J.G.R.; KAUFFMAN, H.F.; VENGE, P.; KOETER, G.H.; JANSEN, H.M.; SLUITER, H.J.; VRIES, K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen - induced late asthmatic reactions. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v. 131, p. 373-376, 1985.
- MOTOJIMA, S.; FRIGAS, E.; LOEGERING, D.A.; GLEICH, G.J. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v. 139, p. 801-805, 1989.
- MUELLER, G.A.; EIGEN, H. Pediatric pulmonary function testing in asthma. **Pediatr. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 39, p. 1243-1258, 1992.
- OLSSON, I.; VENGE, P. Cationic proteins of human granulocytes. **Blood**. New York, v. 44, p. 235-246, 1974.
- PARRILLO, J.E.; FAUCI, A.S. Human eosinophils. Purification and cytotoxic capability of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome. **Blood**, New York, v. 51, p. 457-473, 1978.
- PAUWELS, R.A. Genetic factors controlling airway responsiveness. **Clin. Rev. Allergy**, Clifton, v. 7, p. 235-243, 1989.
- PEMBER, S.O.; BARNES, K.C.; BRANDT, S.J.; KINKADE, J.M. Density heterogeneity of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: gradient fractionation and relationship to chemotactic stimulation. **Blood**, New York, v. 61, p. 1105-1115, 1983.
- PEPYS, J. Skin testing. **Br. J. Hosp. Med.**, London, v.14, p. 412-417, 1975.

- PERSSON, C.G.A. Role of plasma exudation in asthmatic airways. **Lancet**, London, v. 2, p. 1125-1129, 1986.
- PESSÓA, S. B. **Parasitologia médica**, Ed. Guanabara Koogan S.A., p. 423-425, 1954.
- PLATTS-MILLS, T.A.E.; MITCHELL, E.B.; NOCK, P.; TOVEY, E.R.; MOSZORO, H.; WILKINS, S.R. Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. **Lancet**, London, v. 2, p. 675-677, 1982.
- POLGAR, G.; PROMADHAT, V. **Pulmonary function testing in children: techniques and standards**, p. 105-145, Ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1971.
- PRIN, L.; CAPRON, M.; TONNEL, A.B.; BLETRY, O.; CAPRON, A. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and origin of hypereosinophilia. **Int. Arch. allerg. Appl. Immunol.**, Basel, v. 72, p. 336-346, 1983.
- PULLEN, C.R.; HEY, E.N. Wheezing asthma and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. **Br. Med. J.**, London, v. 284, p. 1665-1669, 1982.
- RIBEIRO, M.; SILVA, R.C.C.; PEREIRA, C.A.C. Resposta brônquica ao carbacol em normais e asmáticos leves avaliada por espirometria e pletismografia., **J. Pneumologia**, São Paulo, v. 18 (sup. 2), p. 8, 1992.
- RICHARDSON, P.S.; PLEATFIELD, A.C. The control of airway mucus secretion. **Eur. J. Resp. Dis.**, Copenhagen, v. 153, p. 43-51, 1987.
- RIJCKEN, B.; SCHOUTEN, J.P.; WEISS, S.T.; SPEIZER, F.E.; VAN DER LENDE, R. The relationship between airway responsiveness to histamine and pulmonary function level in a random population sample. **Am. Rev. Resp. Dis.**, New York, v. 136, p. 62-68, 1987.

- ROSÁRIO FILHO, N.A. Níveis séricos da imunoglobulina E em enteroparasitoses. Efeito do tratamento específico, correlação com as contagens de eosinófilos e testes cutâneos para alergia. **Dissertação de Mestrado-UFPR**, Curitiba, 1980.
- ROSÁRIO FILHO, N.A. Comparação entre dois métodos para contagem de eosinófilos no sangue. **Rev. Bras. Alerg. Immunol.**, São Paulo, v. 11, p. 19-22, 1988a.
- ROSÁRIO FILHO, N. A.; JARDIM, M. T.; MIRA, J. G. S. Hipereosinofilia: revisão de suas causas em crianças. **Rev. Med. Paraná**, Curitiba, v. 46(1/2), p. 1-6, 1988b.
- ROSENTHAL, R.R.; CHAI, H.; MATHISON, D.A.; SPECTOR, S.L.; TOWNLEY, R.G. Indications for inhalation challenge. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 64, p. 603, 1979.
- RUGGERO, P.; INVERARDI, L.; BENDER, J.R. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. **Immunology Today**, Cambridge, v. 13, p. 195-238, 1992.
- SAKAMOTO, M.; IDA, S.; TAKISHIMO, T. Effect of influenza virus infection on allergic sensitization to aerosolized ovalbumin in mice. **J. Immunol.**, San Diego, v. 132, p. 2614-2617, 1984.
- SEARS, M. R.; BURROWS, B.; FLANNERY, E. M.; HERBISON, G. B.; HEWITT, C. J.; HOLDAWAY, M. D. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 325, p. 1067-1071, 1991.
- SEHMI, R.; WARDLAW, A.J.; CROMWELL, O.; KAY, B. The eosinophil chemotactic activity of interleukin-8. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 91, p. 312, 1993.
- SHAPIRO, G.G.; FURUKAWA, C.T.; PIERSON, W.E.; BIERMAN, C.W., Methacholine bronchial challenge in children. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 69, p. 365-369, 1982.
- SHELLEY, W. B.; PARNES, H. M. The basophil count. **Jama**, New York, v. 192, p. 368-371, 1965.

- SHULT, P.A.; GRAZIANO, F.M.; WALLOW, I.H.; BUSSE, W.W. Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v. 106, p. 638-645, 1985.
- SHULT, P.A.; LEGA, M.; JADIDI, S.; VRTIS, R.; WARNER, T.; GRAZIANO, F.M.; BUSSE, W.W. The presence of hypodense eosinophils and diminished chemiluminescence response in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 81, p. 429-437, 1988.
- SIBBALD, B.; HORN, M.E.L.C.; BRAIN, E.A.; GREGG, I., Genetic factors in childhood asthma. **Thorax**, London, v. 35, p. 671-674, 1980.
- SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**, Ed. McGraw-Hill Ltda., São Paulo, p.131-143, 1975.
- SPECTOR, S.L.; LUPARELLO, T.J.; KOPETS, M.T.; SOUHRADA, J.; KINSMAN, R.A. Response of asthmatics to methacholine and suggestion. **Am. Rev. Resp. Dis.**, New York, v. 113, p. 43-50, 1976.
- SPIEGEL, M.R. **Probabilidade e estatística**, Ed. McGraw-Hill Ltda., São Paulo, p. 369, 1977.
- SUGAI, T.; SAKIYAMA, Y.; MATUMOTO, S. Eosinophil cationic protein in peripheral blood of paediatric patients with allergic diseases. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v.22, p. 275-281, 1992.
- TANNER, J.M.; WHITEHOUSE, R.H.; TAKAISHI, M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity : British children, 1965. Part II. **Arch. Dis. Child.**, London, v. 41, p. 613-635, 1966.
- TRIGG, C.J.; DAVIES, R.J. Measurement of bronchial responsiveness., **Clin. Rev. Allergy**, Clifton, v. 7, p. 279-300, 1989.

- VADAS, M.A.; DAVID, J.R.; BUTHERWORTH, A.; PISANI, N.T.; SIONGOK, T.A. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of schistosoma mansoni. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 122, p. 1228-1236, 1979.
- VADAS, M.A.; SHANNON, L.M.F.; CLARK-LEWIS, I. Regulation of eosinophilopoiesis in man. In: Morley, J.; Colditz, I. **Eosinophils in asthma**, Academic Press Limited, London, p. 1-11, 1989.
- VENGE, P. The eosinophil granulocyte in allergic inflammation. **Ped. Allergy Immunol.**, Copenhagen, v. 4, p. 19-24, 1993a.
- VENGE, P. Serum measurements of eosinophil cationic protein (ECP). **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 23, p. 3-7, 1993b.
- VENGE, P.; DAHL, R.; PETERSON, C.G.B. Eosinophil granule proteins in serum after allergen challenge of asthmatic patients and the effects of anti-asthmatic medication, **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, Basel, v. 87, p. 306-312, 1988.
- VENGE, P.; HAKANSSON, L. Current understanding of the role of the eosinophil granulocyte in asthma. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v.21, p. 31-37, 1991.
- VENGE, P.; PETERSON, C.G.B. Eosinophil biochemistry and killing mechanisms. In: MORLEY, J.; COLDITZ, I. **Eosinophils in asthma**, Academic Press Limited, London, p. 125-140, 1989.
- VENGE, P.; ROXIN, L.E.; OLSSON, I. Radioimmunoassay of human eosinophil cationic protein. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 37, p. 331-335, 1977.
- VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**, Ed. Atlas S.A., São Paulo, p. 80, 1989.
- WARREN, D.J.; MOORE, M.A.S. Sinergism among interleukin-1, interleukin-3, and interleukin-5 in the production of eosinophils from primitive hemopoietic stem cell. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 140, p. 94-99, 1988.

- WEGNER, C.D.; GUNDEL, R.H.; REILLY, P.; HAYNES, N.; LETTS, L.G.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science*, Washington, v. 247, p. 456-459, 1990.
- WEGNER, C.D.; KOKER, P.J.; GUNDEL, R.H. Relationship between eosinophils and airway reactivity in monkeys. *Am. Rev. Respir. Dis.*, New York, v. 135, p. A-222, 1987.
- WELLER, P. F. Eosinophils: structure and functions. *Curret opinion Immunol.*, London, v. 6, p. 85-90, 1994.
- WELLER, P.F. Eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 73, p. 1-11, 1984.
- WINQVIST, I.; OLOFFSON, T.; OLSSON, I.; PERSSON, A.M.; HALLBERG, T. Altered density metabolism and surface receptors of eosinophil in eosinophilia. *Immunology*, Oxford, v. 47, p. 531-539, 1982.
- WOOLCOCK, A.J.; PEAT, J.K. Epidemiology of bronchial hyperresponsiveness. *Clin. Rev. Allergy*, Clifton, v. 7, p. 245-256, 1989.
- WOOLCOCK, A.J.; PEAT, J.K.; SALOME, C.M.; YAN, K.; ANDERSON, S.D.; SCHOEFFEL, R.E.; McCOWAGE, G.; KILLALEN, T. Prevalence of bronchial hyperresponsiveness and asthma in a rural adult population. *Thorax*, London, v. 42, p. 361-368, 1987.
- YAMADA, T.; EBISAWA, M.; MACGLASHAN, D.W.; BICKEL, C.; OPPENHEIM, J.J.; BOCHNER, B.S.; SCHLEIMER, R.P. RANTES is a chemoattractant for human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 91, p. 314, 1993.
- ZIMMERMAN, B. Clinical experience with the measurement of ECP: usefulness in the management of children with asthma. *Clin. Exp. Allergy*, Oxford, v. 23, p. 8-12, 1993.
- ZIMMERMAN, B.; FEANNY, S.; REISMAN, J.; HAK, H.; RASHED, N.; MCLAUGHLIN, F. J.; LEVISON, H. Allergy in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v. 81, p. 63-70, 1988.

ANEXOS

ANEXO I - SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS INDIVIDUALMENTE PARA O GRUPO DE NORMAIS

NÚMERO	NOME	SEXO	IDADE	PESO	ALTURA	DIAG	TC	VEF ₁	DP ₂₀	EOS	EH	IgE _T	IgE _E	ECP
01	VCG	1	13	38	149	0(-)	1	86		216	11	17,40	0,00	
02	APO	2	12	40	146	0(-)	1	119		65	10	68,40	0,00	11,7
03	MACS	1	9	23	121	0(+)	1	90	3,200	328	8	81,00	0,00	
04	JFR	2	13	33	155	0(-)	1	80		52	4	21,10	0,00	4,9
05	DCR	2	8	22	135	0(-)	1	89		68	16	45,10	0,00	3,8
06	JB	1	15	43	158	0(+)	1	80		78	16	310,40	0,00	15,9
07	DLGON	1	10	37	135	0(-)	1	101		390	29	12,10	0,00	
08	MCSL	2	12	43	157	0(+)	1	112		385	14	163,00	0,00	
09	ACM	2	12	40	146	0(-)	1	80		195	11	15,70	0,00	
10	EGS	1	10	34	140	0(+)	1	93		168	6	271,40	0,00	6,8
11	HLS	1	9	22	130	0(-)	1	101		246	5	35,30	0,00	3,1
12	FGS	1	11	34	134	0(+)	1	119		399	21	95,00	0,00	7,2
13	DRSM	2	10	33	138	0(+)	1	95		52	7	61,20	0,00	
14	JAC	2	12	37	145	0(+)	1	97		146	12	70,10	0,00	9,8
15	VMG	2	9	30	135	0(+)	1	105		297	14	279,00	0,00	
16	MBRM	2	10	38	143	0(-)	1	111		180	13	22,60	0,00	5,2
17	TL	1	13	60	162	0(-)	1	106		183	5	3,30	0,00	2,6
18	ML	2	8	24	125	0(-)	1	107		154	9	3,30	0,00	4,7

TC (Teste Cutâneo): 1=negativo. SEXO: 1=masculino; 2=feminino

DIAG: 0 = Normal. (+): com antecedentes familiares de atopia; (-): sem antecedentes familiares de atopia

ANEXO II - SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS INDIVIDUALMENTE PARA O GRUPO I DE ASMÁTICOS

NÚMERO	NOME	SEXO	IDADE	PESO	ALTURA	DIAG	TC	VEF ₁	DP ₂₀	EOS	LEUC	EH	IgE _T	IgE _E	ECP
01	KCG	2	8	25	126	1	2	100	0,500	840	8400	44	2001,0	100,00	16,6
02	EBP	2	14	41	158	1	2	109	3,800	676	3050	25	2460,0	22,00	28,9
03	AHE	1	7	34	134	1	2	88	0,250	1612	12400	33	958,0	14,00	20,9
04	MLT	1	12	41	140	1	2	85	25,000	740	14800	17	1434,0	100,00	
05	PMBG	1	9	28	133	1	2	92	0,500	1761	10000	58	594,0	32,00	12,6
06	HBN	1	10	30	132	1	2	81	0,350	1830	12200	41	1563,0	29,00	
07	LCR	1	12	46	156	1	2	94	6,000	195	6500	15	806,0	4,50	7,8
08	SFS	1	12	36	147	1	2	84	1,300	224	5600	31	418,0		
09	WLPJ	1	11	34	136	1	2	86		274	9100	34	350,0	0,52	8,2
10	TBR5	1	9	29	126	1	2	80	0,100	296	7400	38	1302,0	72,00	11,3
11	PCS	2	12	36	147	1	2	89	1,400	1585	13200	50	2647,0	100,00	
12	EGTS	1	6	22	125	1	2	94	6,300	300	10000	58	29,9	50,00	
13	ASG	1	12	42	145	1	2	90		180	3600	28	413,0	1,70	4,9
14	OKN	1	9	27	146	1	2	97		219	7300	40	1237,0	0,68	
15	GMG	2	9	27	135	1	2	91	4,800	670	4500	45	1491,0	100,00	7,4
16	RPN	2	9	33	142	1	2	92		672	8400	60	102,0	0,00	10,4
17	RR	2	13	51	152	1	2	105		836	7600	35	170,0	0,44	10,1
18	RLA	1	12	32	152	1	2	99		450	7500	56	1327,0	50,00	
19	JFVP	2	14	53	156	1	2	102		107	10700	6	163,0	2,40	
20	CSO	2	11	34	140	1	2	88	5,000	627	5700	40	398,0	32,00	9,5

TC (Teste Cutâneo): 2=positivo ao *D. pteronyssinus*. DIAG: 1= grupo Asma I

ANEXO III - SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS INDIVIDUALMENTE PARA O GRUPO II DE ASMÁTICOS

NÚMERO	NOME	SEXO	IDADE	PESO	ALTURA	DIAG	TC	VEF ₁	DP ₂₀	EOS	EH	IgE _T	IgE _E	ECP
01	ARF	1	10	38	142	2	2	65		497	41	850,0	37,0	
02	RTL	2	14	51	155	2	2	83	0,10	800	40	589,0	80,0	98,8
03	ASP	1	9	27	129	2	2	98	0,10	690	78	1767,0	100,0	
04	JS	1	14	55	163	2	2	108	3,20	496	40	1367,0	72,0	24,9
05	MAS	1	11	37	147	2	2	88	5,00	232	23	410,0	0,9	
06	DRA	2	9	30	138	2	2	90	2,80	1155	33	791,0	100,0	17,2
07	YL	1	10	37	147	2	2	95	0,09	962	38	1998,0	100,0	
08	RCC	2	11	30	143	2	2	101	2,00	1088	45	514,0	100,0	21,9
09	CS	2	10	30	142	2	2	89	0,20	1450	48	2703,0	100,0	9,5
10	TRG	2	12	36	151	2	2	84	5,50	665	35	1333,0	100,0	19,4
11	MMR	2	13	35	148	2	2	71		1098	57	2756,0	100,0	14,1
12	LSF	1	13	49	158	2	2	61		490	28	93,0	5,0	
13	MPRL	1	11	30	137	2	2	54		100	44	1652,0	100,0	
14	ELE	1	9	34	145	2	2	48		1802	63	484,0	23,5	114,1
15	JB	2	13	35	140	2	2	43		1392	15	1634,0	32,0	11,9
16	AHA	2	11	42	147	2	2	75		1070	50	607,5	40,0	20,2
17	RLR	2	13	35	152	2	2	58		924	40	2335,0	100,0	
18	LMJ	1	14	50	160	2	2	45		1280	52	2248,0	62,0	
19	RCO	1	10	44	141	2	2	91	3,50	830	35	3045,0	100,0	8,6
20	AKMA	1	16	49	160	2	2	102	0,01	425	32	734,0	100,0	12,7
21	EAS	1	9	27	138	2	2	55		600	18	1285,0	46,0	
22	AAS	2	13	31	142	2	2	63		245	27	1328,0	100,0	6,6
23	RA	2	13	53	159	2	2	44		650	35	1677,0	100,0	11,8

TC (Teste Cutâneo): 2=positivo ao *D. pteronyssinus*. DIAG: 2= grupo Asma II

ANEXO IV - RESULTADOS DAS CORRELAÇÕES E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS PRINCIPAIS VARIÁVEIS ESTUDADAS NOS INDIVÍDUOS NORMAIS. AVALIAÇÃO PELO TESTE NÃO-PARAMÉTRICO DE SPEARMAN

NORMAL	VEF ₁	DP ₂₀	EOS.	EOS.H.	ECP	IgE _T	IgE _E
VEF ₁	<u>1*</u> 0,00#						
DP ₂₀	<u>0,48</u> 0,03	<u>1</u> 0,00					
EOS.	<u>0,33</u> 0,17	<u>0,31</u> 0,19	<u>1</u> 0,00				
EOS.H.	<u>0,18</u> 0,46	<u>0,48</u> 0,03	<u>0,38</u> 0,11	<u>1</u> 0,00			
ECP	<u>0,01</u> 0,96	<u>0,12</u> 0,90	<u>-0,04</u> 0,89	<u>0,62</u> 0,02	<u>1</u> 0,00		
IgE _T	<u>0,03</u> 0,87	<u>0,35</u> 0,14	<u>0,06</u> 0,79	<u>0,29</u> 0,24	<u>0,48</u> 0,10	<u>1</u> 0,00	
IgE _E	-	-	-	-	-	-	<u>1</u> 0,00

* Correlação (r) # Nível de significância (p)

ANEXO V - RESULTADOS DAS CORRELAÇÕES E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS PRINCIPAIS VARIÁVEIS ESTUDADAS NOS PACIENTES ASMÁTICOS DO GRUPO I. AVALIAÇÃO PELO TESTE NÃO-PARAMÉTRICO DE SPEARMAN

ASMA I	VEF ₁	DP ₂₀	EOS.	EOS.H.	ECP	IgE _T	IgE _E
VEF ₁	1* 0,00#						
DP ₂₀	0,36 0,12	1 0,00					
EOS.	-0,09 0,67	-0,45 0,04	1 0,00				
EOS.H.	0,02 0,91	-0,10 0,65	0,43 0,05	1 0,00			
ECP	0,22 0,47	-0,61 0,03	0,78 0,00	0,34 0,27	1 0,00		
IgE _T	-0,08 0,70	-0,43 0,05	0,44 0,04	0,01 0,95	0,41 0,18	1 0,00	
IgE _E	-0,23 0,33	-0,43 0,06	0,33 0,15	0,25 0,28	0,25 0,42	0,62 0,00	1 0,00

* Correlação (r) # Nível de significância (p)

ANEXO VI - RESULTADOS DAS CORRELAÇÕES E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS PRINCIPAIS VARIÁVEIS ESTUDADAS NOS PACIENTES ASMÁTICOS DO GRUPO II. AVALIAÇÃO PELO TESTE NÃO-PARAMÉTRICO DE SPEARMAN

ASMA II	VEF ₁	DP ₂₀	EOS.	EOS.H.	ECP	IgE _T	IgE _E
VEF ₁	1* 0,00#						
DP ₂₀	-0,33 0,30	1 0,00					
EOS.	-0,11 0,59	-0,10 0,60	1 0,00				
EOS.H.	0,08 0,68	-0,28 0,39	0,43 0,03	1 0,00			
ECP	0,16 0,58	0,12 0,66	0,20 0,48	0,54 0,04	1 0,00		
IgE _T	-0,04 0,84	-0,06 0,84	0,26 0,21	0,25 0,23	-0,69 0,00	1 0,00	
IgE _E	0,42 0,04	-0,04 0,90	0,11 0,59	0,24 0,26	-0,35 0,21	0,60 0,00	1 0,00

* Correlação (r) # Nível de significância (p)

ANEXO VII - RESULTADOS DAS CORRELAÇÕES E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS PRINCIPAIS VARIÁVEIS ESTUDADAS REUNINDO OS PACIENTES ASMÁTICOS DOS GRUPOS I E II. AVALIAÇÃO PELO TESTE NÃO-PARAMÉTRICO DE SPEARMAN

ASMA I + II	VEF ₁	DP ₂₀	EOS.	EOS.H.	ECP	IgE _T	IgE _E
VEF ₁	1* 0,00#						
DP ₂₀	0,15 0,39	1 0,00					
EOS.	-0,13 0,37	-0,48 0,001	1 0,00				
EOS.H.	0,03 0,81	-0,20 0,27	0,41 0,005	1 0,00			
ECP	0,03 0,84	-0,34 0,08	0,52 0,001	0,54 0,04	1 0,00		
IgE _T	-0,13 0,38	-0,43 0,01	0,38 0,01	0,15 0,32	0,04 0,82	1 0,00	
IgE _E	-0,06 0,67	-0,30 0,05	0,26 0,09	0,24 0,12	-0,35 0,21	0,65 0,001	1 0,00

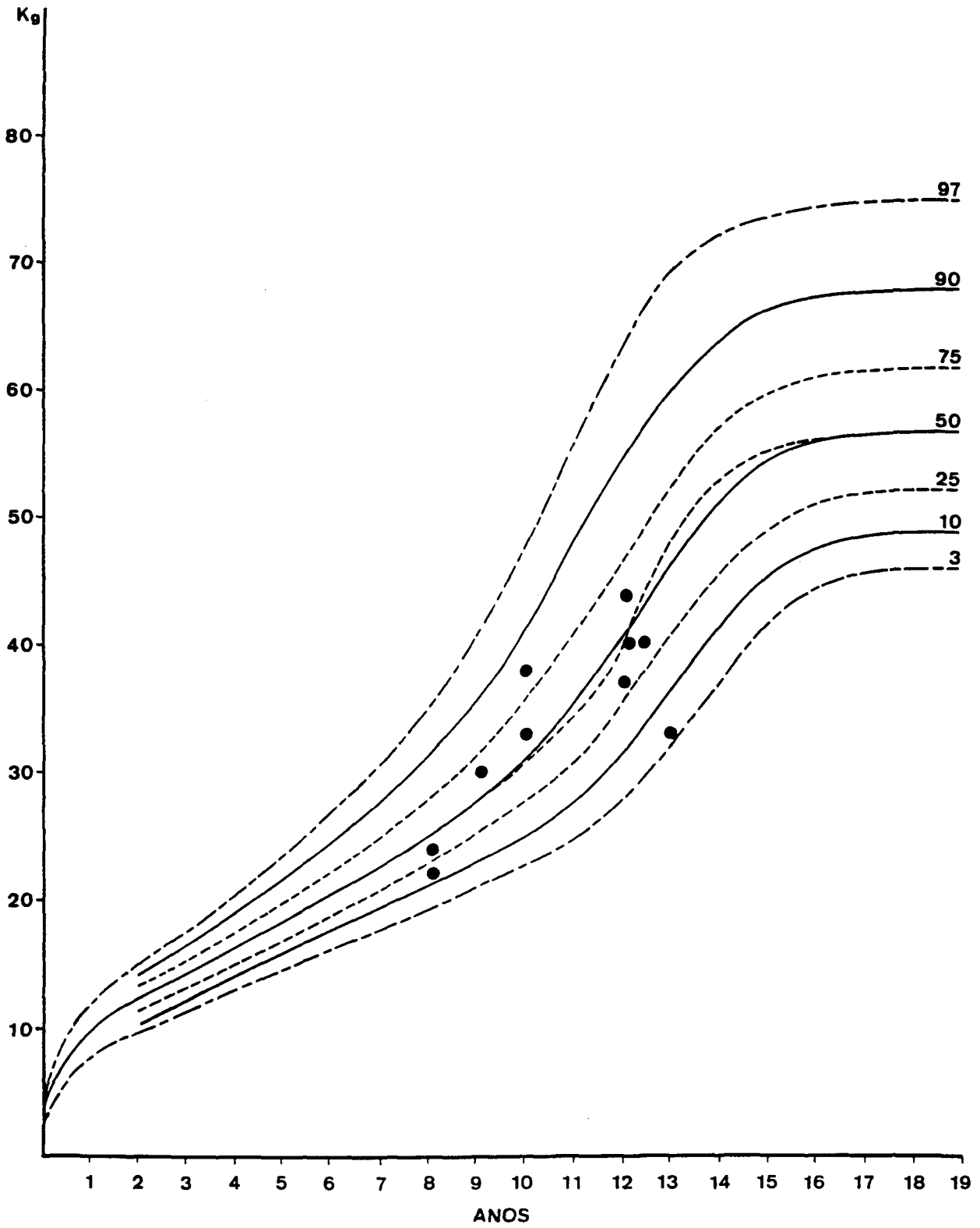
* Correlação (r) # Nível de significância (p)

ANEXO VIII - NÍVEIS SÉRICOS DA PROTEÍNA CATIÔNICA EOSINOFÍLICA (ECP) NOS TRÊS GRUPOS ESTUDADOS

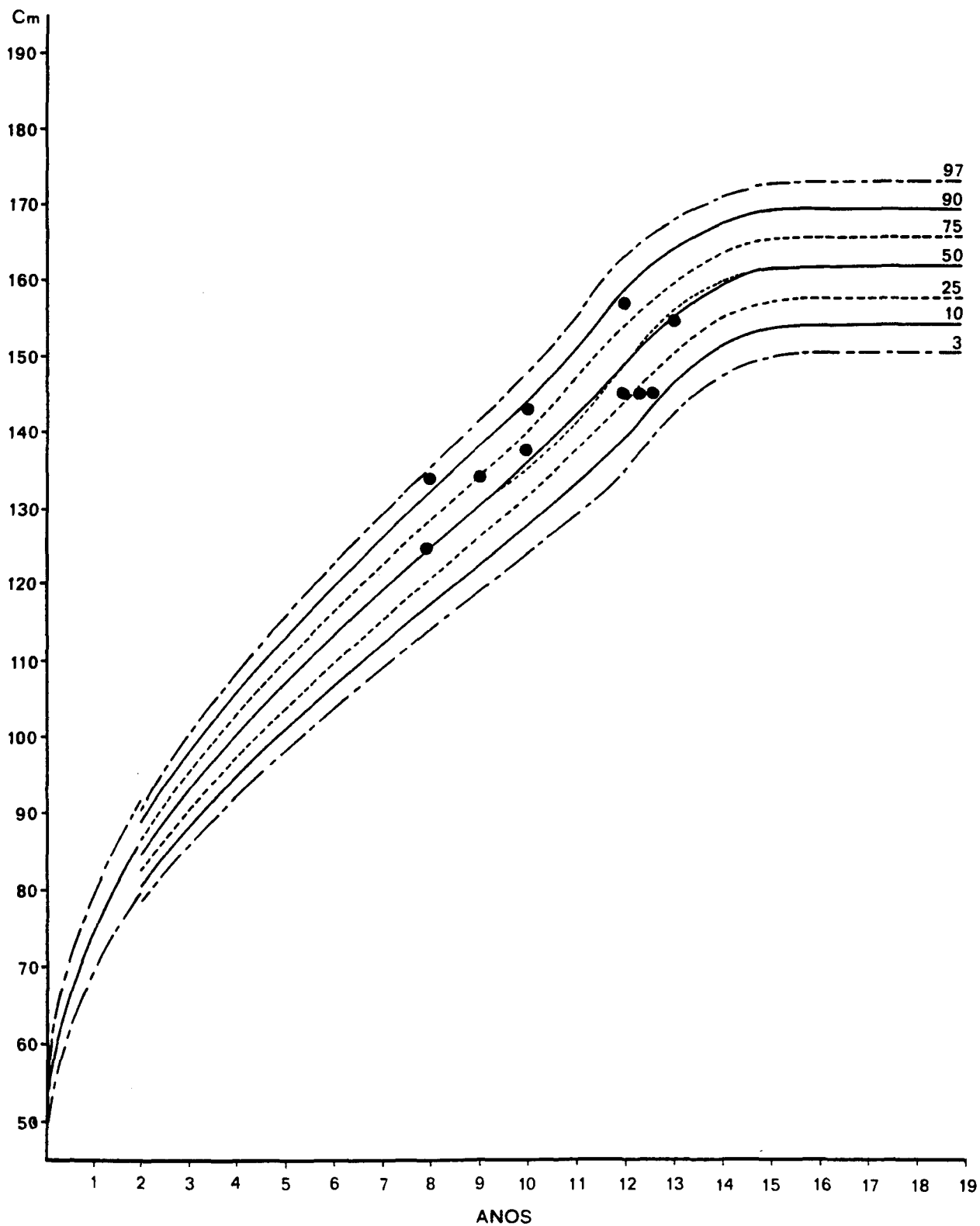
GRUPO	n	ECP (mcg/l)
NORMAL	11/18	6,8 ± 1,2 (2,6-15,9)
ASMA I	12/20	12,3 ± 1,9 (4,9-28,9)
ASMA II	14/23	27,9 ± 7,7 (6,6-114,1)

Média ±EPM; () limites.

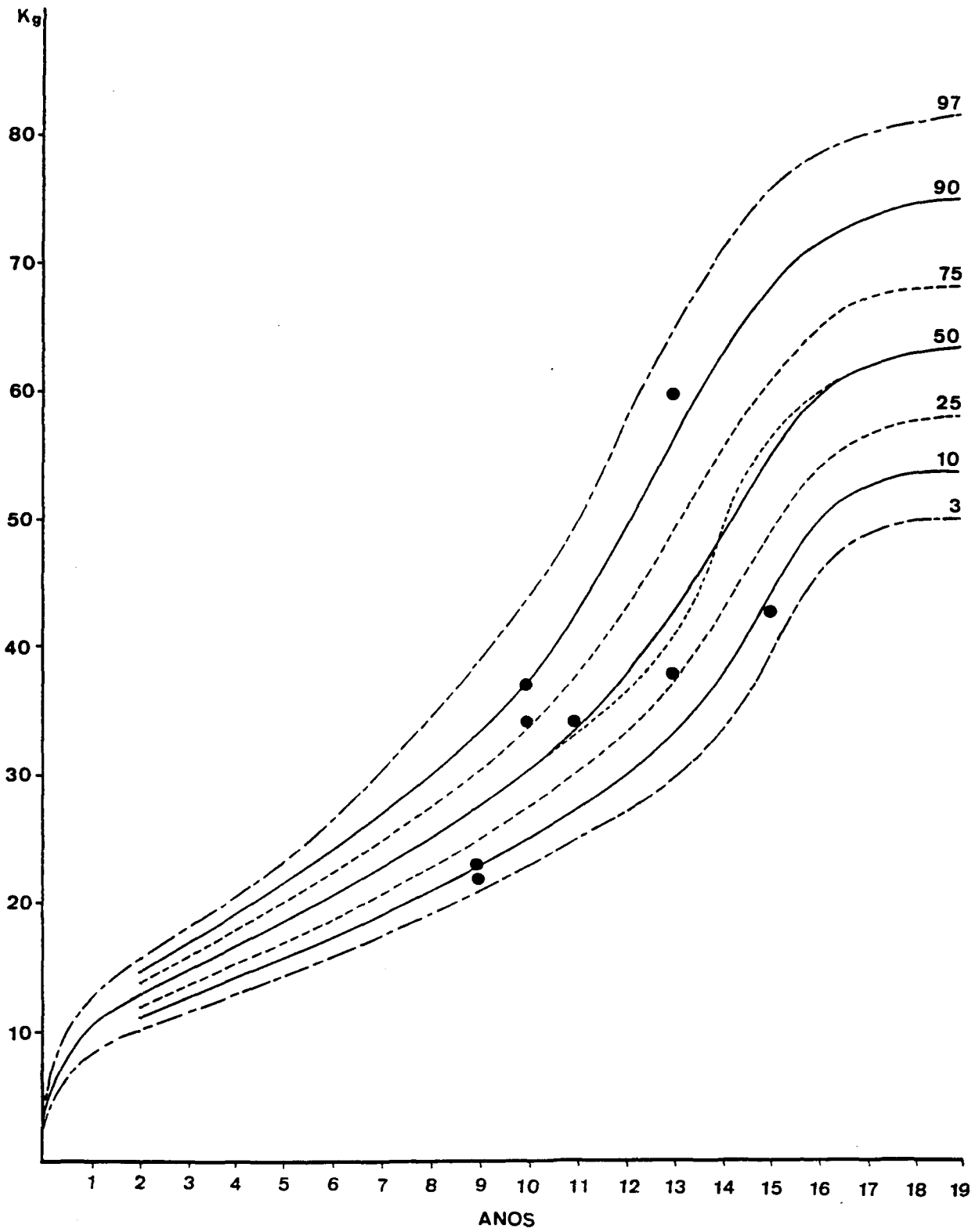
H: 13,9 , p < 0,0009 (Normal ≠ Asma I ≠ Asma II)



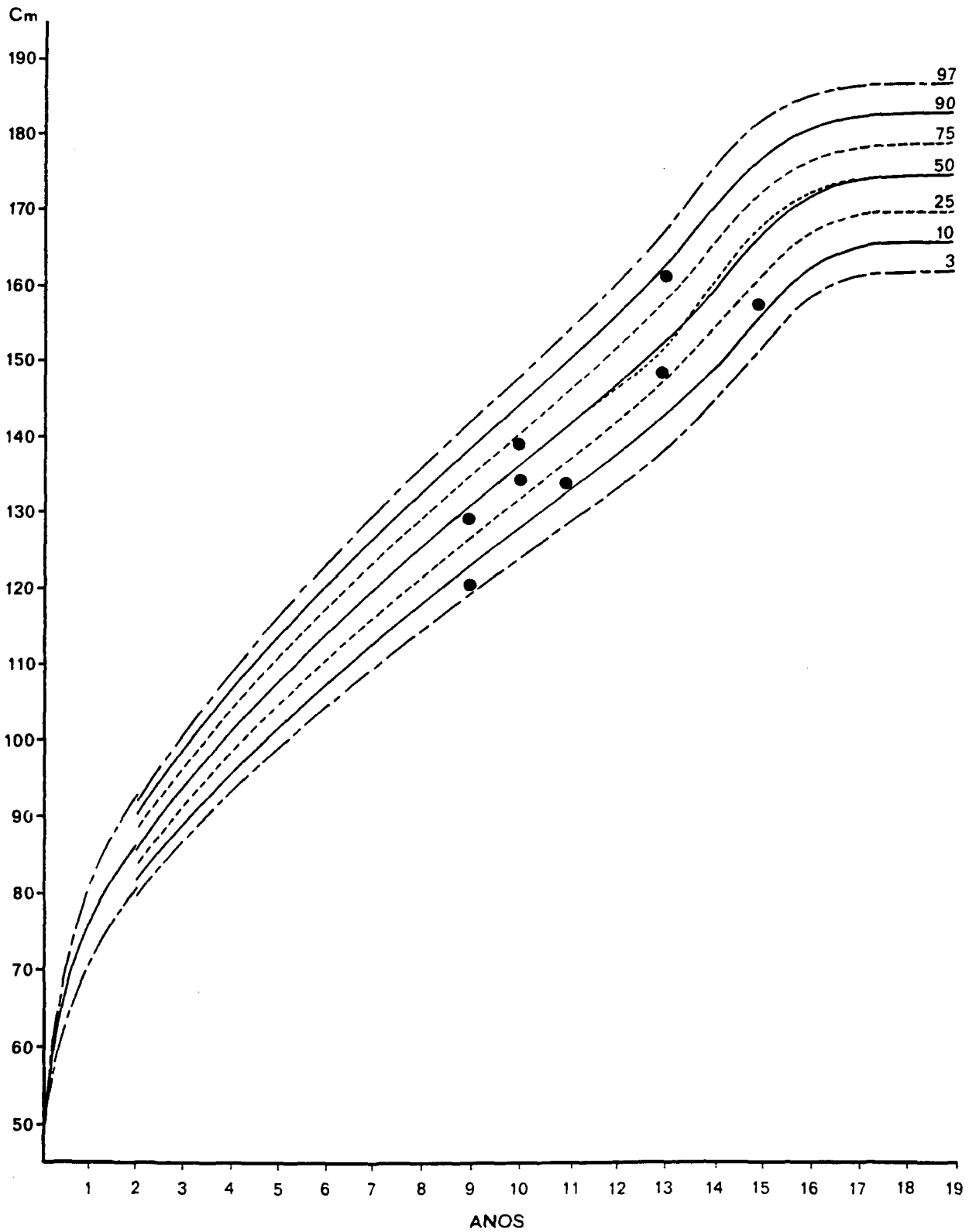
ANEXO IX - DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS NORMAIS DO SEXO FEMININO CONFORME O PESO. TABELA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE TANNER E WHITEHOUSE
• INDIVÍDUOS NORMAIS



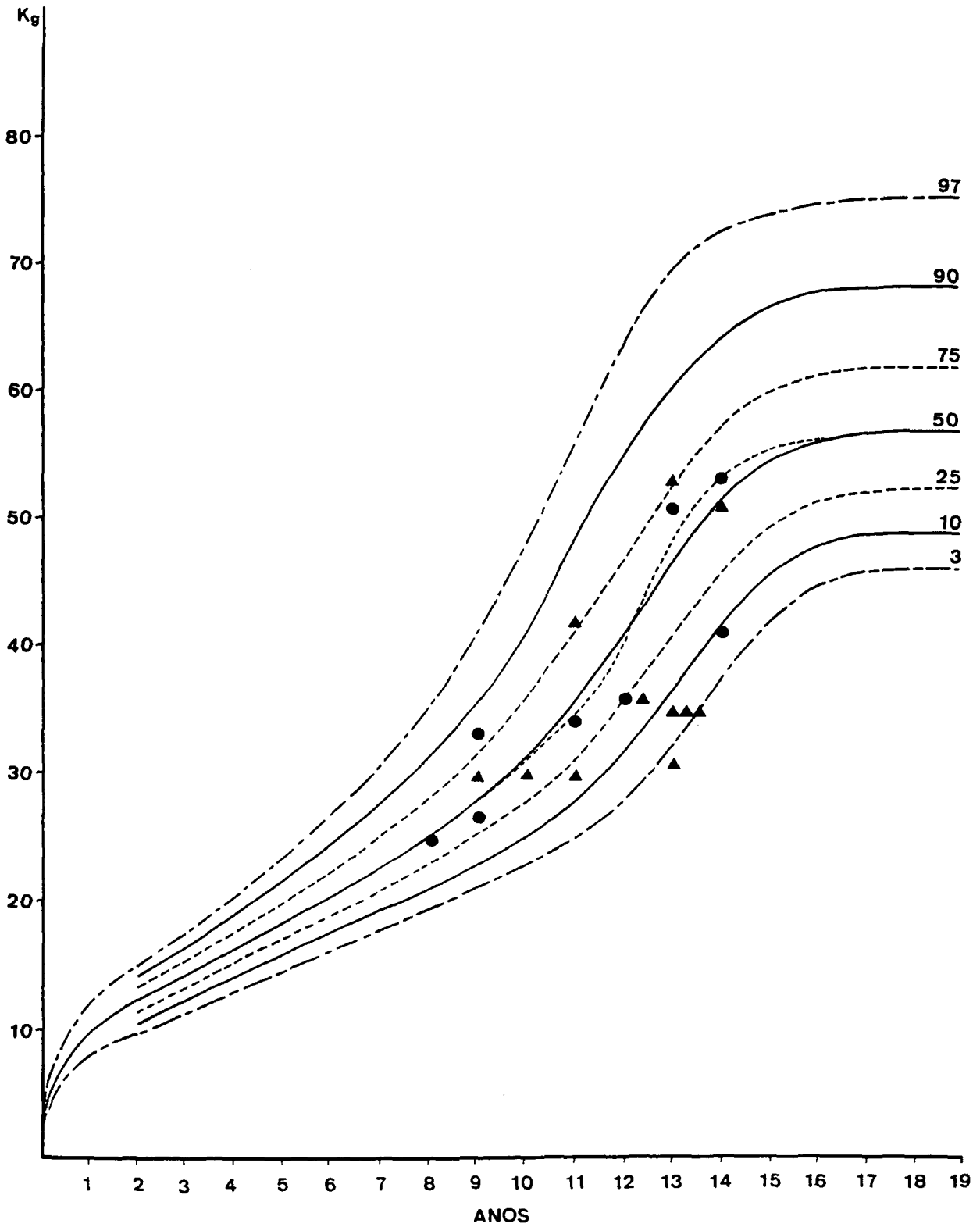
ANEXO X - DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS NORMAIS DO SEXO FEMININO CONFORME A ALTURA. TABELA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE TANNER E WHITEHOUSE
 • INDIVÍDUOS NORMAIS



ANEXO XI - DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS NORMAIS DO SEXO MASCULINO CONFORME O PESO. TABELA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE TANNER E WHITEHOUSE
 • INDIVÍDUOS NORMAIS

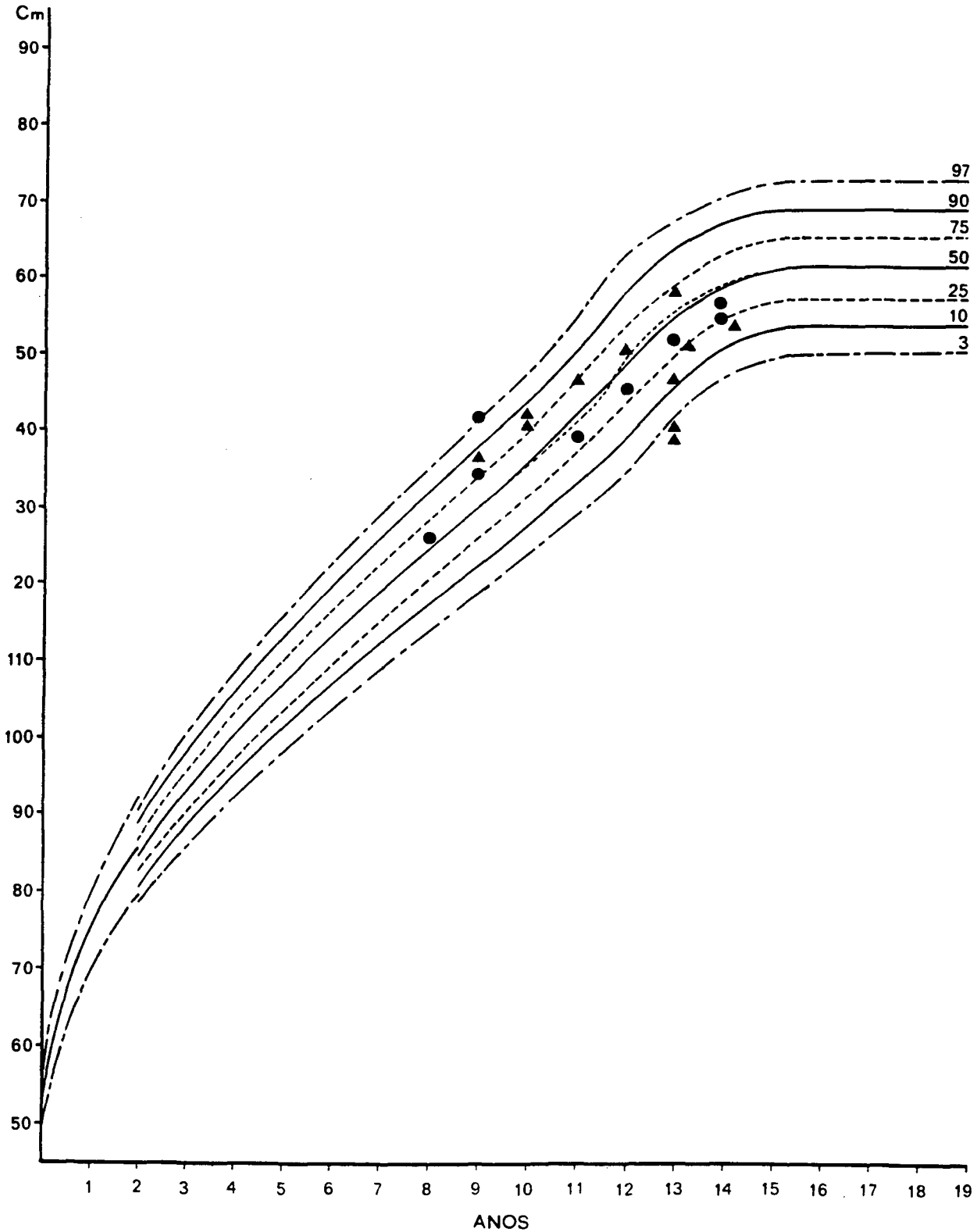


ANEXO XII - DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS NORMAIS DO SEXO MASCULINO CONFORME A ALTURA. TABELA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE TANNER E WHITEHOUSE
 • INDIVÍDUOS NORMAIS



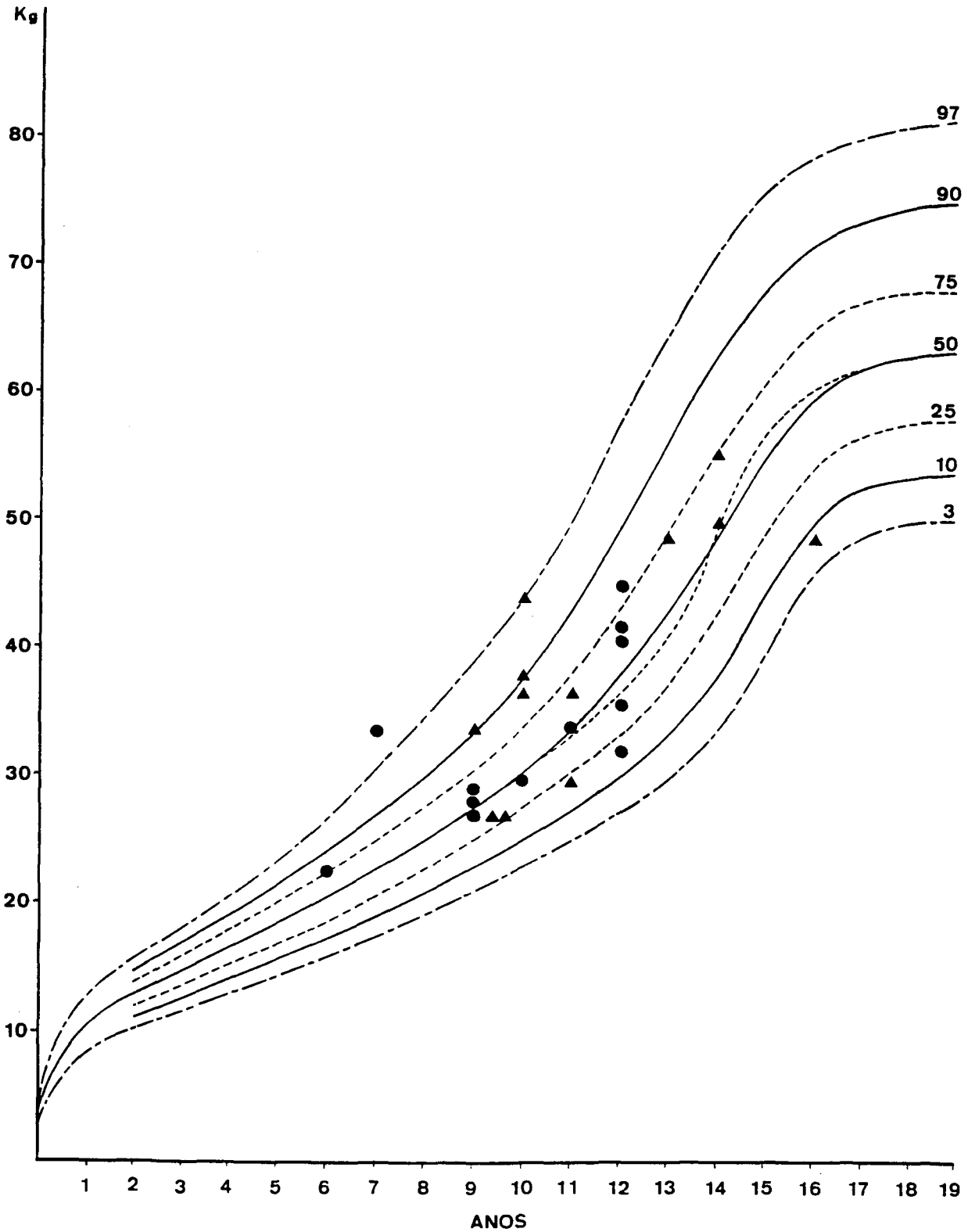
ANEXO XIII - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES ASMÁTICOS DOS GRUPOS I E II DO SEXO FEMININO CONFORME O PESO. TABELA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE TANNER E WHITEHOUSE

• ASMA I ▲ ASMA II



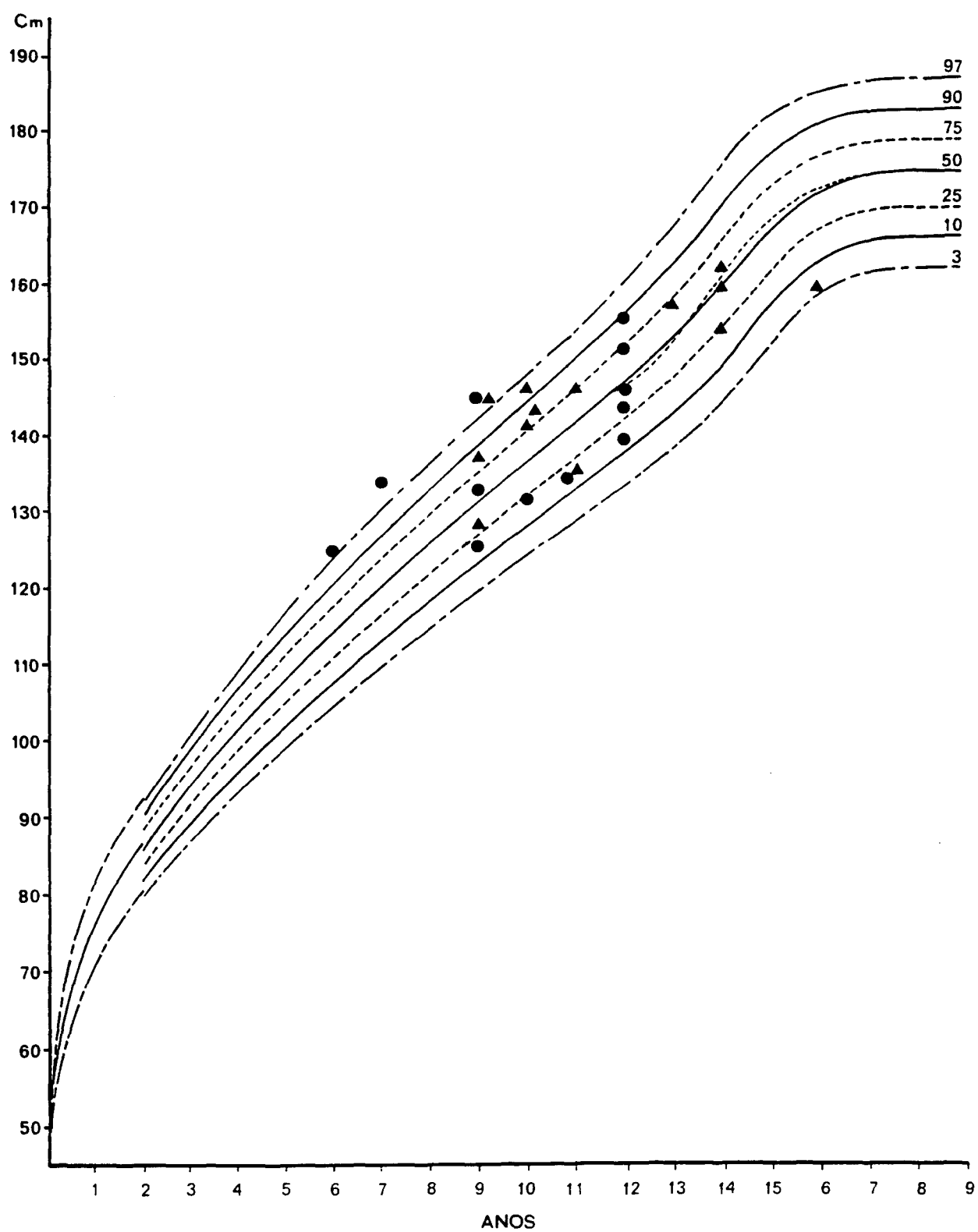
ANEXO XIV - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES ASMÁTICOS DOS GRUPOS I E II DO SEXO FEMININO CONFORME A ALTURA. TABELA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE TANNER E WHITEHOUSE

• ASMA I ▲ ASMA II



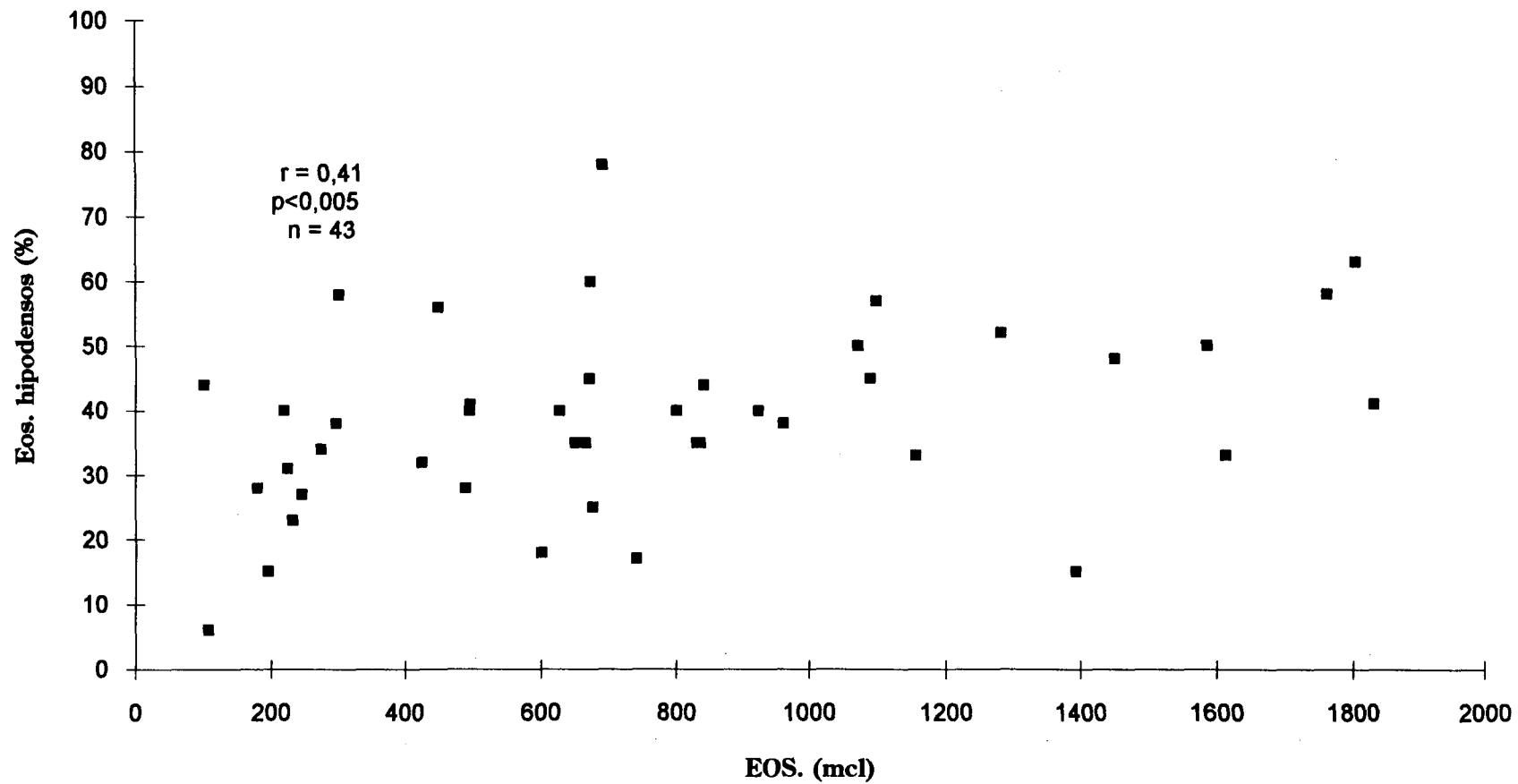
ANEXO XV - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES ASMÁTICOS DOS GRUPOS I E II DO SEXO MASCULINO CONFORME O PESO. TABELA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE TANNER E WHITEHOUSE

• ASMA I ▲ ASMA II

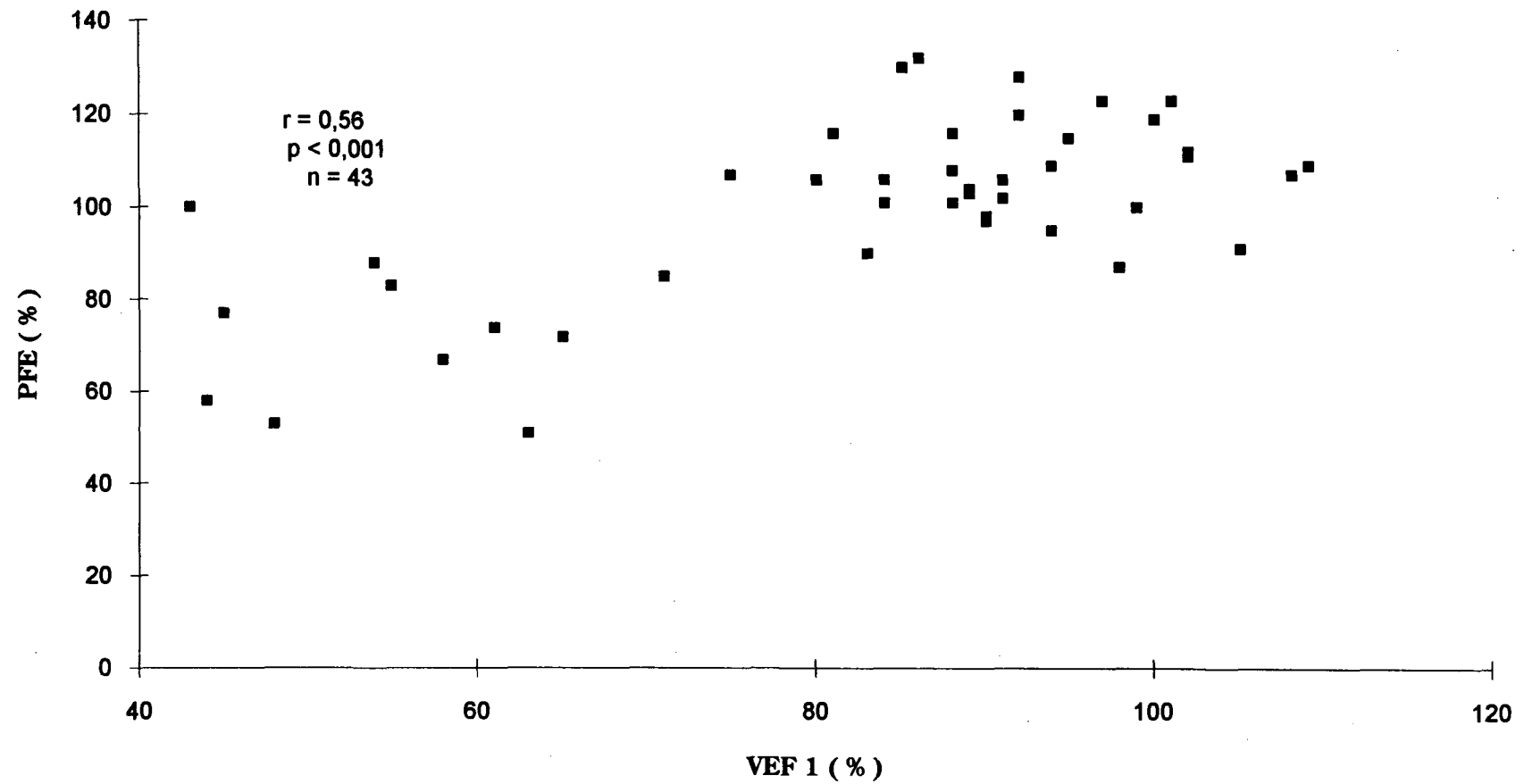


ANEXO XVI - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES ASMÁTICOS DOS GRUPOS I E II DO SEXO MASCULINO CONFORME A ALTURA. TABELA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE TANNER E WHITEHOUSE

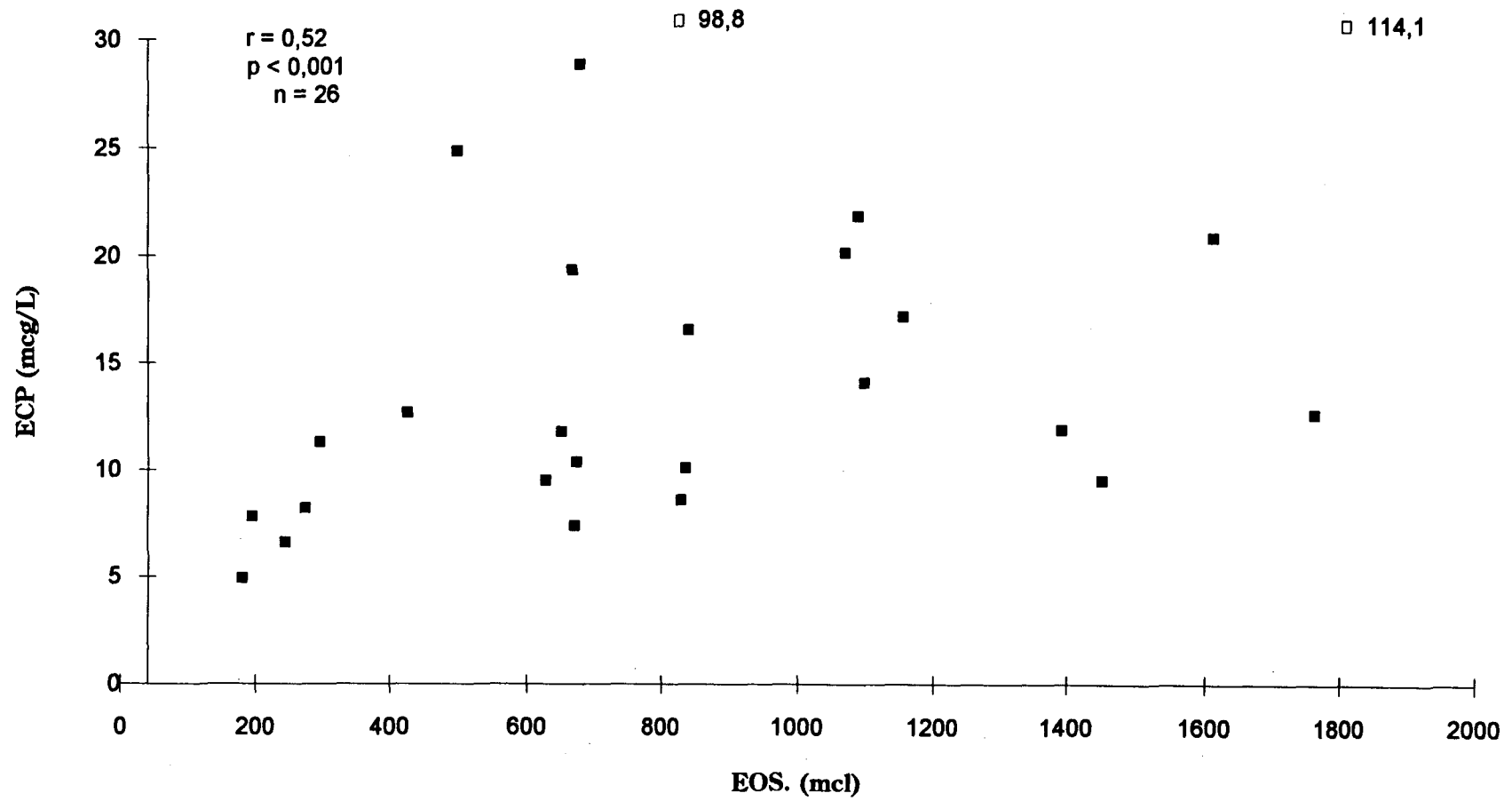
• ASMA I ▲ ASMA II



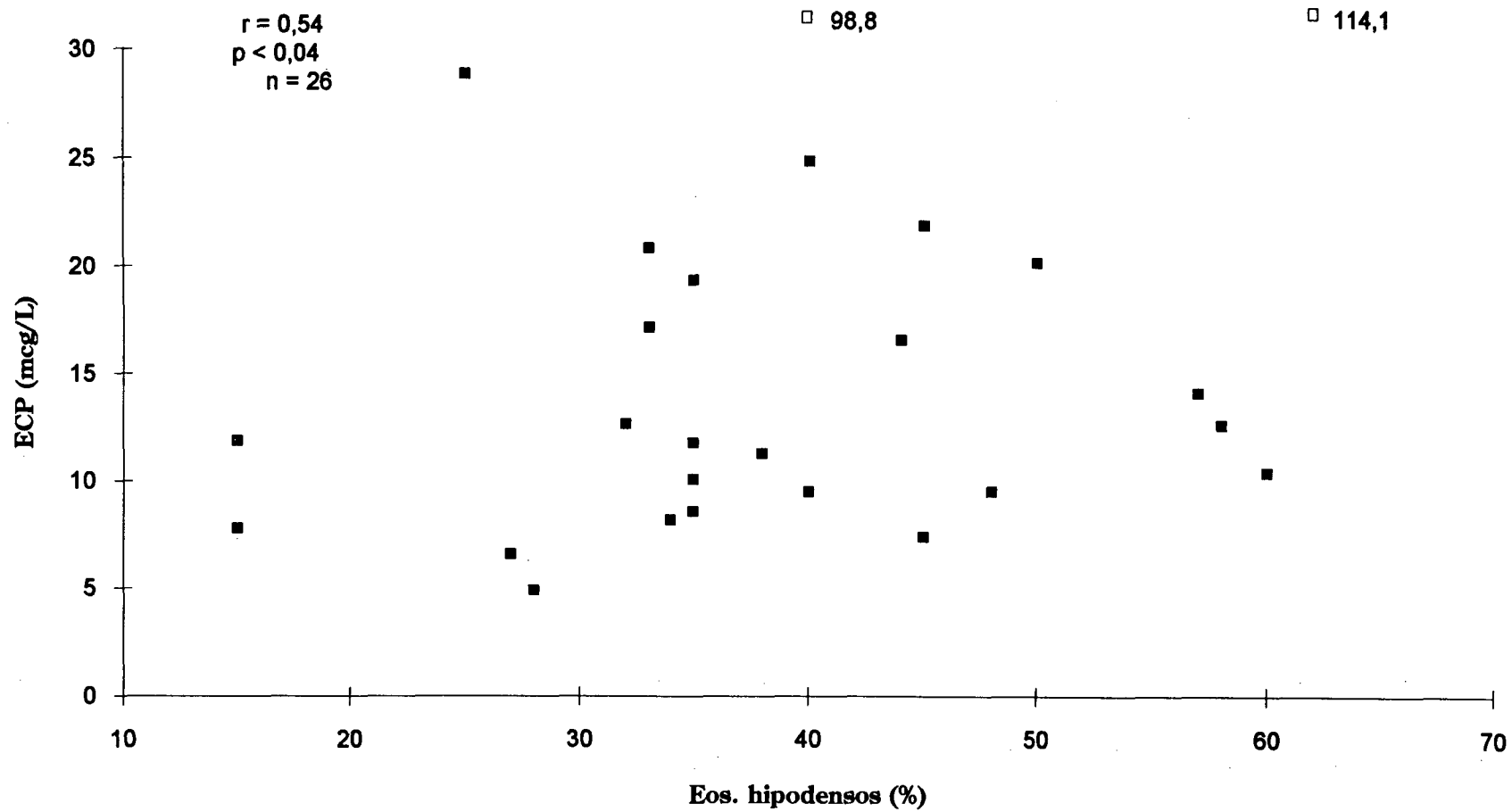
ANEXO XVII - CORRELAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE EOSINÓFILOS HIPODENSOS COM EOSINÓFILOS EM SANGUE PERIFÉRICO NOS PACIENTES ASMÁTICOS. AVALIAÇÃO PELO MÉTODO NÃO-PARAMÉTRICO DE SPEARMAN



ANEXO XVIII - CORRELAÇÃO ENTRE VEF₁ E PFE EM PACIENTES ASMÁTICOS. TESTE NÃO-PARAMÉTRICO DE SPEARMAN



ANEXO XIX - CORRELAÇÃO ENTRE EOSINÓFILOS E ECP EM PACIENTES ASMÁTICOS. TESTE NÃO-PARAMÉTRICO DE SPEARMAN



ANEXO XX - CORRELAÇÃO ENTRE EOSINÓFILOS HIPODENSOS E ECP EM PACIENTES ASMÁTICOS. TESTE NÃO-PARAMÉTRICO DE SPEARMAN