

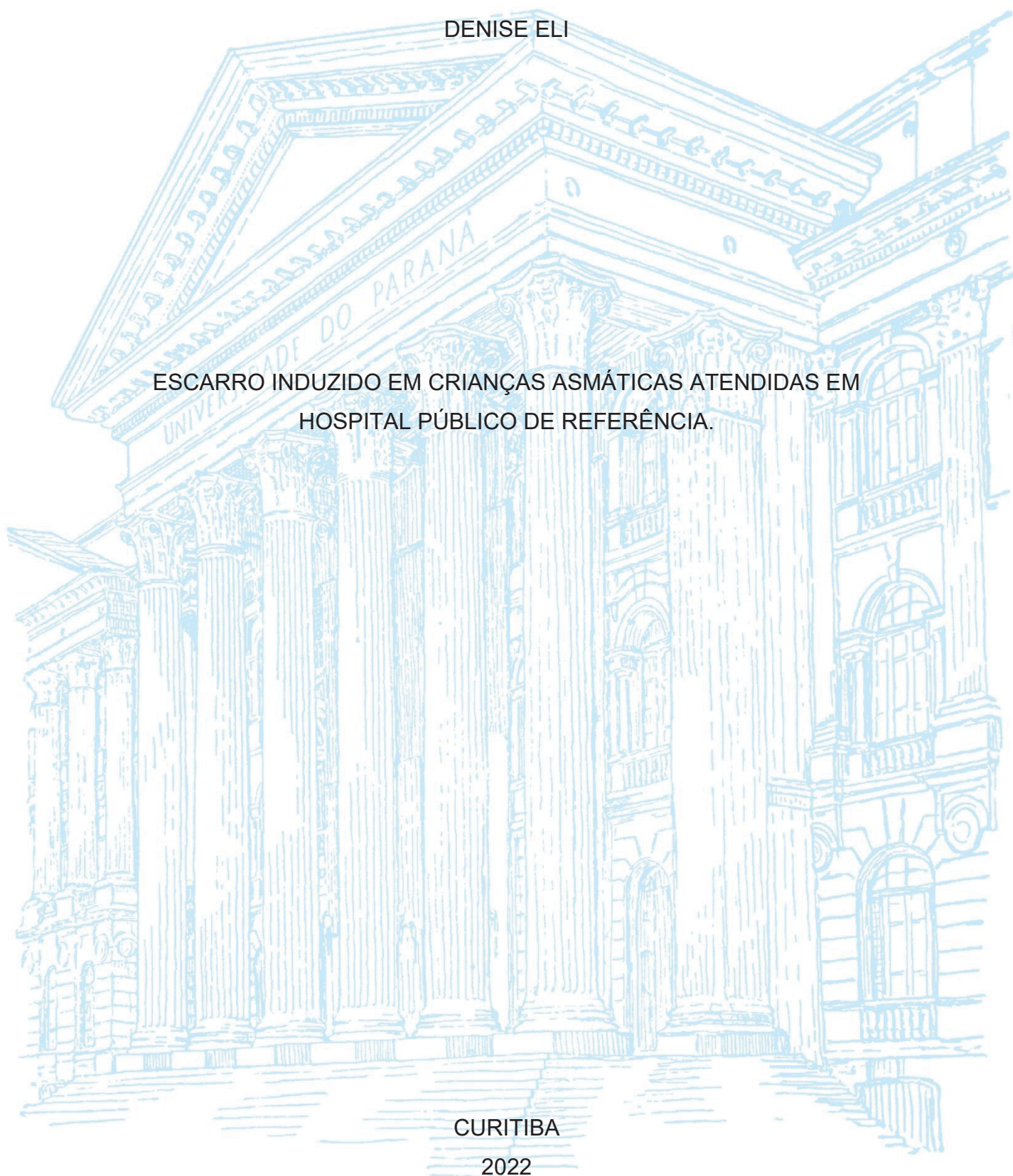
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DENISE ELI

ESCARRO INDUZIDO EM CRIANÇAS ASMÁTICAS ATENDIDAS EM
HOSPITAL PÚBLICO DE REFERÊNCIA.

CURITIBA

2022



DENISE ELI

ESCARRO INDUZIDO EM CRIANÇAS ASMÁTICAS ATENDIDAS EM
HOSPITAL PÚBLICO DE REFERÊNCIA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Saúde da Criança e Adolescente.

Orientadora: Prof^a Dra. Débora Carla Chong e Silva.

Coorientadores: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho e Prof. Dr. Sérgio Luiz Bach.

CURITIBA

2022

E42 Eli, Denise
Escarro induzido em crianças asmáticas atendidas em hospital público de referência [recurso eletrônico] / Denise Eli. – Curitiba, 2022.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Carla Chong e Silva.

Coorientadores: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho
Prof. Dr. Sérgio Luiz Bach.

1. Escarro – Citologia. 2. Asma – Prevenção e controle.
3. Criança. I. Chong-Silva, Débora Carla. II. Rosário Filho, Nelson Augusto. III. Bach, Sérgio Luiz. IV. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

NLM: QY 120

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991

TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE - 40001016013P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DENISE ELI** intitulada: **Escarro induzido em crianças asmáticas atendidas em hospital público de referência**, sob orientação da Profa. Dra. DEBORA CARLA CHONG E SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica
31/08/2022 09:34:42.0
DEBORA CARLA CHONG E SILVA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
02/09/2022 16:05:48.0
SERGIO LUIZ BACH
Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica
31/08/2022 11:23:31.0
NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO
Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica
31/08/2022 12:49:29.0
MARCIA MARGARETH MENEZES PIZZICHINI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
31/08/2022 14:06:56.0
FELIPE FORTINO VERDAN DA SILVA
Avaliador Externo (COMPLEXO HOSPITAL DE CLÍNICAS)

Assinatura Eletrônica
02/09/2022 17:32:58.0
LÉDA MARIA RABELO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua General Carneiro, 181 - 14º andar - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80060-900 - Tel: (41) 3360-7994 - E-mail: ppgsca@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 219120

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 219120

“Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida e a oportunidade de conquistar meus sonhos, autor do meu destino e meu guia, socorro presente na hora da angústia e do medo. Aos meus pais Osmar Eli e Rita Eli, minha irmã Solange Eli e aos meus sobrinhos Matheus Eli R. Duarte, inspiração para este tema e Luís Gustavo R. Duarte, pelo apoio na reta final”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Das vidas terrenas, agradeço minha orientadora Profa. Dra. Débora C. Chong e Silva, meus Coorientadores Prof. Dr. Nelson Rosário e Prof. Dr. Sérgio L. Bach; à equipe do NUPAIVA HU-UFSC, onde realizei meu treinamento para reproduzir a técnica; à equipe de pneumologia e alergologia pediátrica do CHC-UFPR, aos meus colegas de trabalho pela compreensão nos momentos de ausência e incentivo todos os dias, à minha família e amigos por todo apoio.

RESUMO

A asma é uma doença respiratória crônica que atinge aproximadamente 15% da população infantil mundial, sendo que a classificação adequada da gravidade e o acompanhamento da doença são fundamentais para melhorar a qualidade e de vida destas crianças. A avaliação da citologia do escarro induzido é uma técnica descrita para entendimento da inflamação brônquica. Este estudo propôs avaliar celularidade do escarro induzido em crianças de 5 a 14 anos, com diagnóstico de asma, acompanhadas em serviço especializado de referência; verificar a efetividade do método da indução do escarro nesta faixa etária; identificar celularidade escarro do grupo de asmáticos avaliados; avaliar a associação dos padrões citológicos encontrados com variáveis clínicas e epidemiológicas e com o controle da asma. O grupo foi composto por 42 participantes, 66,7% do sexo masculino; com média de idade de 8,4 ($\pm 1,9$), 54,8% tinham casos de asma na família e 78,6% eram atópicos. Vinte e seis pacientes estavam com a asma controlada. O padrão de escarro eosinofílico foi o predominante nos 42 pacientes. Foi observada maior presença de granulações eosinofílica no grupo de asma não controlada ($p=0,042$) e número maior de macrófagos no grupo de asma controlada ($p=0,027$). A indução do escarro mostrou-se segura e viável na população pediátrica. O padrão inflamatório eosinofílico predomina entre as crianças asmáticas deste grupo. Granulações eosinofílicas predominaram na asma sem controle e macrófagos na asma controlada. A avaliação da citologia do escarro é um instrumento útil para a avaliação dos fenótipos da asma pediátrica na prática clínica.

Palavras-chave: Crianças, citologia de escarro, controle da asma.

ABSTRACT

Asthma is a chronic respiratory disease that affects approximately 15% of the world's child population, and the proper classification of severity and diseases monitoring are essential to improve the quality and life of these children. The evaluation of induced sputum cytology is a technique described for assessment bronchial inflammation. This study aimed to evaluate the cellularity of induced sputum in children aged 5 to 14 years, diagnosed with asthma, followed up at a specialized referral service; to verify the effectiveness of the sputum induction method in this age group; to identify sputum cellularity in the group of asthmatics evaluated; to evaluate the association of the cytological patterns found with clinical and epidemiological variables and with asthma control. The group consisted of 42 participants, 66.7% male; with a mean age of 8.4 (± 1.9), 54.8% had asthma in the family and 78.6% were atopic. Twenty-six patients had controlled asthma. The eosinophilic sputum pattern was predominant in the 42 patients. A greater presence of eosinophilic granulations was observed in the uncontrolled asthma group ($p=0.042$) and a greater number of macrophages in the controlled asthma group ($p=0.027$). Sputum induction proved to be safe and feasible in the pediatric population. The eosinophilic inflammatory pattern predominates among asthmatic children in this group. Eosinophilic granulations predominated in uncontrolled asthma and macrophages in controlled asthma. Sputum cytology assessment is a useful tool for the understanding of pediatric asthma phenotypes in clinical practice.

Keywords: Children, sputum cytology, asthma control.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Cascata inflamatória da asma.....	21
FIGURA 2: Fluxograma da indução e colheita de escarro e frequência de espécimes de escarro obtidas.....	31
FIGURA 3: Fluxograma do processamento dos espécimes.....	32
FIGURA 4: Fluxograma da leitura da lâmina e classificação do padrão celular do escarro.	33
FIGURA 5: Distribuição em percentual de células em asma controlada e asma não controlada.....	46
FIGURA 6: Ilustração da presença de grânulos de eosinófilos nos espécimes de escarro.	48

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Distribuição dos padrões de escarro nos espécimes estudados.	42
GRÁFICO 2: Presença de grânulos de eosinófilos nas amostras de pacientes com asma controlada e não controlada.	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características sociodemográficas e de atopia do grupo de estudo.	39
TABELA 2: Associação entre asma controlada e não controlada com variáveis clínicas, epidemiológicas e dados de tratamento.	41
TABELA 3: Resultado da citologia de escarro das 42 amostras estudadas.....	42
TABELA 4: Comparação entre os grupos eosinofílico e não eosinofílico com as variáveis clínicas, epidemiológicas e dados de tratamento.	44
TABELA 5: Resultados da citologia de escarro dos grupos asma controlada e não controlada.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ACT	Teste de controle da asma (Asthma Control Test)
Células/mL	Células por mililitro
CHC	Complexo Hospital de Clínicas
DTT	Ditiotreitol
FeNO	Óxido nítrico exalado
GINA	Global Initiative for Asthma
IFN – γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarideo
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão salina fosfato (Phosphate buffered saline)
PCE	Proteína catiônica eosinofílica
PFE	Pico de fluxo respiratório
Th	Linfócito T helper
TNF – α	Fator de necrose tumoral
UFPR	Universidade Federal do Paraná

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA	14
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo Principal	15
1.2.2 Objetivos Secundários.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA NA INFÂNCIA	17
2.2 FISIOPATOLOGIA DA ASMA	17
2.3 CLASSIFICAÇÃO DO CONTROLE DA ASMA	21
2.4 CITOLOGIA DO ESCARRO INDUZIDO.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 TIPO DE ESTUDO	25
3.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO.....	25
3.3 POPULAÇÃO ALVO.....	25
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	26
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	26
3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO	26
3.7 TÉCNICA DE AMOSTRAGEM.....	26
3.8 VARIÁVEIS E PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	27
3.9 TABULAÇÃO E GERENCIAMENTO DE DADOS	34
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
3.11 ÉTICA EM PESQUISA	35
3.12 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA.....	35
3.13 LIMITAÇÕES DA PESQUISA	35
3.14 FOMENTO PARA PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS	36
4. RESULTADOS	37
4.1 DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA ATOPIA	37
4.2 CONTROLE DA ASMA	39
4.3 AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA DE ESCARRO	41
4.4 ASSOCIAÇÃO DA CELULARIDADE DO ESCARRO COM O CONTROLE DA ASMA	44
5. DISCUSSÃO	49

5.2 DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA ATOPIA. ...	50
5.3 CONTROLE DA ASMA.....	52
5.4 PADRÕES CITOLÓGICOS DO ESCARRO	53
5.5 CITOLOGIA DO ESCARRO	54
6. CONCLUSÕES.....	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE 67	
APÊNDICE 2 – ACT (ASTHMA CONTROL TEST).....	72
ANEXO 1 – PARECER SUBSTANCIADO CEP	73
ANEXO 2 – RESUMO PUBLICADO: CONGRESSO ASBAI, 2019.	76
ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO: JORNAL BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA, 2019.	77
ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO: PEDIATRIC PNEUMOLOGY, 2020	80

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença respiratória heterogênea e de evolução crônica, que acomete adultos e crianças em todo o mundo (SALDANHA et al., 2014; PIZZICHINI et al., 2020).

A apresentação clínica é caracterizada por sintomas diversos, entre eles tosse e sibilância, envolvendo graus variáveis de limitação de fluxo aéreo. Tipicamente, essas alterações ocorrem associadas a inflamação e remodelamento das vias respiratórias. Na infância, os mecanismos envolvidos na apresentação da sibilância são distintos, e podem ser estabelecidos a partir da idade de início dos sintomas, presença de atopia e associação com infecções virais (SALDANHA et al., 2014; CHONG-NETO et al., 2020).

Aproximadamente 15% da população infantil mundial tem diagnóstico de asma, refletindo em alto impacto pessoal e social, uma vez que a doença sem controle leva a atendimentos de emergência de repetição, intervenções hospitalares, uso de medicamentos, faltas à escola e piora na qualidade de vida do paciente (DREWS et al., 2006; GINA, 2022). Em países desenvolvidos, tem sido importante causa de internação hospitalar, principalmente em crianças com idade inferior a cinco anos, nível socioeconômico baixo e com tratamento profilático realizado de forma inadequada (MCGEACHIE et al., 2016).

Crianças com pais asmáticos apresentam maior probabilidade de desenvolverem asma. Entretanto os fatores ambientais influenciam no desencadear dos sintomas da doença, como a urbanização, poluição *outdoor*, clima frio, mudanças bruscas de temperatura, infecção do trato respiratório superior e inferior no início da vida, contato com fungos/ácaros, fatores dietéticos, respostas imunológicas anormais, exposição passiva ao tabaco. Parte destes fatores agem diretamente nas vias respiratórias, desencadeando resposta inflamatória e conseqüentemente edema, hipersecreção de muco e contração da musculatura lisa brônquica. Além disso, crianças asmáticas podem ter crescimento e desenvolvimento pulmonar anormal levando a maior risco de problemas respiratórios ao longo da vida (DREWS et al., 2006; PALOMINO et al., 2005, LOZANO et al., 2012; FORO DE LAS SOCIEDADES RESPIRATORIAS INTERNACIONALES, 2017).

A classificação adequada da gravidade e do controle da asma são fundamentais para melhorar a qualidade e perspectiva de vida das pessoas acometidas pela doença. Para determinar o grau de controle, habitualmente é realizado um inquérito sobre os sintomas clínicos nas últimas quatro semanas, por meio de questionários padronizados. Esses instrumentos foram desenvolvidos para classificar a asma em controlada e não controlada, de acordo com a apresentação de sintomas (sintomas diurnos, sintomas noturnos, necessidade de medicação de alívio, limitação para realizar atividades físicas, número de exacerbações (ROXO et al., 2010). Essa avaliação, juntamente com a avaliação pulmonar das crianças asmáticas buscam melhorar o acompanhamento e a terapêutica desses pacientes (PIZZICHINI et al., 2020).

Nas últimas décadas, a medicina de precisão, tem sido utilizada para melhorar a caracterização dos fenótipos da asma e estabelecer alternativas de tratamento para aqueles pacientes com asma grave não controlada, os quais são um desafio na rotina de clínicos e especialistas. Considerando a validade do método bem como o resultado satisfatório na colheita de uma amostra viável, como já foi demonstrada em estudos anteriores em crianças (GROOTENDORST, 2002; MORITZ, 2008; MOELLER, 2015) a técnica foi aplicada no presente estudo.

1.1 JUSTIFICATIVA

A citologia do escarro induzido é uma técnica segura, não invasiva e de custo acessível capaz de contribuir para melhor entendimento da inflamação das vias aéreas, podendo ser indicado na rotina laboratorial para o auxílio ao diagnóstico, acompanhamento e orientação das condutas terapêuticas, de acordo com os achados na contagem diferencial das células presentes na amostra e identificação do padrão inflamatório presente (VIANNA, 2008).

Está técnica permite avaliar o padrão inflamatório brônquico do paciente asmático. O conhecimento deste padrão inflamatório, hoje descritos como eosinofílico, neutrofilico, misto (eosinófilos e neutrófilos elevados) e paucigranulocítico (níveis normais de eosinófilos e neutrófilos), pode auxiliar na

conduta terapêutica, com a escolha do tratamento específico e ajustados para cada caso.

Diretrizes consagradas como o GINA (*Global Initiative for Asthma*) recomendam a identificação do padrão celular do escarro, nos centros onde a indução está estabelecida, e a partir do resultado desse exame, personalizar o tratamento com corticoides ou terapias complementares aos pacientes com quadros de asma eosinofílica grave sem controle e também conhecer as células envolvidas nos padrões não eosinofílico e, assim direcionar o tratamento individualizado (FLEMING et al., 2012; SIMPSON & BAFADHEL, 2017).

A avaliação citológica do escarro induzido é uma técnica segura, não invasiva e de baixo custo, que possibilita diferir o padrão inflamatório das vias aéreas em crianças com asma. Auxilia também na orientação das terapias, diminuir a necessidade de internações hospitalares e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Avaliar o padrão inflamatório pulmonar das crianças asmáticas, nos diferentes graus de controle da doença, poderá contribuir com o entendimento da asma controlada e asma não controlada, buscando conhecer os processos patológicos envolvidos e nortear o manejo da doença grave na infância.

O Complexo do Hospital de Clínicas (CHC) é um hospital de atenção terciária e apresenta potenciais recursos tecnológicos para imediata implantação a avaliação rotineira da citologia de escarro no Serviço de Análises Clínicas e atender às necessidades dos serviços de doenças respiratórias, reforçando o padrão de excelência na assistência especializada aos pacientes com diagnóstico de asma e que necessitam de tratamento personalizado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Principal

Avaliar o padrão celular do escarro induzido em crianças de 5 a 14 anos, com diagnóstico de asma, acompanhadas em um serviço especializado de referência.

1.2.2 Objetivos Secundários

- a) Verificar a exequibilidade do método da indução do escarro em crianças pré-escolares e escolares com asma;
- b) Identificar a composição celular no escarro do grupo de asmáticos avaliados;
- c) Avaliar a associação dos padrões citológicos encontrados com variáveis clínicas e epidemiológicas;
- d) Avaliar associação dos padrões encontrados na asma controlada e não controlada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA NA INFÂNCIA

A asma é considerada uma doença crônica que acomete cerca de 334 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo mais comum da infância e adolescência, e sua prevalência tem aumentado nas últimas três décadas. Atualmente cerca de 250 mil óbitos no mundo foram causados por asma (MARQUES et al., 2022). No ano de 2007, as doenças respiratórias foram responsáveis por 30% dos óbitos infantis nos países em desenvolvimento (MARTINS et al., 2011).

Na América Latina a prevalência de asma em toda a população está acima de 10% em todos os países. O Brasil tem alta prevalência de asma pediátrica, a qual tem sido a causa de aproximadamente 30% do total de internações infantis e por cerca de 12% das readmissões nos primeiros seis meses após a internação inicial, sendo que crianças do sexo masculino têm maior risco em comparação com meninas da mesma idade, assim como a obesidade tem sido associada ao maior risco de desenvolver a doença (SIILVA & DIAS, 2013; WANG et al., 2016).

No Sul do país 20% das crianças em idade escolar apresentam o diagnóstico de asma (CARDOSO et al., 2017). Somente no estado do Paraná, nos anos entre 2000 e 2015, houve 1.024.951 registros de hospitalizações de crianças menores de cinco anos, e a asma foi a causa de 8,8% destas internações (PREZOTTO et al., 2017).

2.2 FISIOPATOLOGIA DA ASMA

A asma é uma doença respiratória crônica heterogênea, caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas inferiores, causando inflamação do sistema respiratório e limitações no fluxo respiratório, os quais podem ser reversíveis naturalmente ou com tratamento, mas também podem ser irreversíveis (ARAGÃO et al., 2012; SALDANHA et al., 2014; BOONPIYATHAD et al., 2019).

Os sintomas apresentados com maior frequência são dispneia, sibilância e tosse. A doença pode surgir em qualquer idade, entretanto os sintomas e crises aparecem nos primeiros cinco anos de vida (SALDANHA et al., 2014).

A asma pode ter sua gênese ainda na vida intrauterina, uma vez que fatores genéticos e ambientais estão estreitamente relacionados ao desenvolvimento e crescimento do sistema respiratório, tornando-o mais sensível aos alérgenos e desenvolvendo processos inflamatórios. Entretanto os fatores genéticos, para serem ativados, necessitam que haja contato com fatores ambientais, como os alérgenos inaláveis (ácaros, fungos, insetos, pólen), os vírus respiratórios, (infecções pelo vírus sincicial respiratório) nos primeiros anos de vida e poluentes ambientais (como a fumaça de cigarro e poluentes particulados) (SILVA & DIAS, 2013; BOONPIYATHAD et al., 2019).

O processo inflamatório da asma é complexo, envolve mediadores químicos e diferentes células, tais como eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, macrófagos, mastócitos, células epiteliais e células do endotélio vascular. Esses elementos promovem resposta exagerada das vias aéreas à diversos estímulos, ocasionando obstrução reversível das vias aéreas (BOONPIYATHAD et al., 2019).

Os linfócitos possuem importante função na regulação e expressão da asma. Os alérgenos entram em contato primeiramente com as células dendríticas do epitélio brônquico; estas células quando expostas ao fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e na presença da IL-4 iniciam a captação e processamento do antígeno (alérgeno) com isso migram para os linfonodos, onde irão apresentar o antígeno aos linfócitos T *helper* (Th). Esses linfócitos se diferenciam em Th1 e Th2, sendo os linfócitos T auxiliares CD4⁺ (Th2), os quais secretam interleucina (IL)- 4, IL-5 e IL-13, que promovem a síntese de IgE, e consequente recrutamento de mastócitos, basófilos e eosinófilos (GIAVINA-BIANCHI, 2017; RODRIGUES et al., 2021).

Os mastócitos, basófilos e eosinófilos liberam histamina e leucotrienos. Os fatores quimiotáticos liberados, junto aos fatores liberados pelas células Th2 CD4⁺, facilitam a saída do eosinófilo da medula óssea até as paredes das vias aéreas. Esta resposta, aliadas aos mediadores liberados pelas células NKT e Th2 CD4⁺, resultam na produção excessiva de muco, edema, inflamação na parede

dos brônquios, hiper-responsividade e broncoespasmo das vias aéreas (Acharya; Ackerman, 2014).

Os eosinófilos, atraídos para o tecido respiratório, são leucócitos presentes na circulação sanguínea, originários da medula óssea e presentes também nos tecidos celulares periféricos. São células pertencentes ao sistema imunológico inato e que contêm grânulos citotóxicos em seu citoplasma. O processo de degranulação pode ocorrer por quatro mecanismos, sendo eles:

- 1- Exocitose clássica: grânulos se fundem com a membrana citoplasmática, ocorre liberação de um único conteúdo.
- 2- Exocitose composta: dois ou mais grânulos se fundem antes de unirem-se a membrana celular, ocorre a liberação simultânea de múltiplos conteúdos granulares.
- 3- Degranulação fragmentada: citocinas são depletadas dos grânulos e transportadas por vesículas secretoras até a membrana plasmática. Nessa modalidade os grânulos permanecem no interior da célula.
- 4- Citólise: grânulos intactos são liberados para o espaço extracelular através do rompimento ou desintegração da membrana plasmática (MAHMUDI-AZER et al., 2010; MELO et al., 2013).

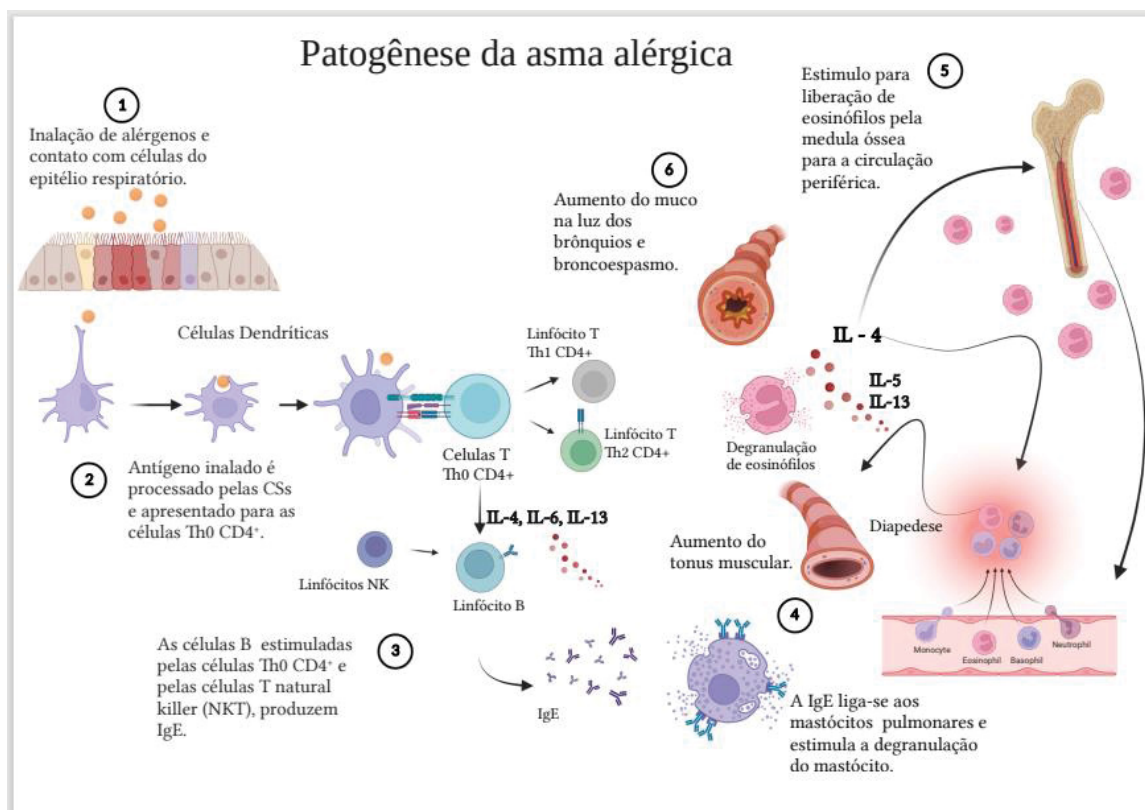
Por estes mecanismos, são liberadas proteínas tóxicas, como neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO), proteína básica principal (MBP), ativação mediada por citocinas (IL-5), prostaglandinas e leucotrienos (PELAIA et al., 2020).

As proteínas dos grânulos têm efeitos antiparasitários, antitumorais e antibacterianos, porém são citotóxicas para o epitélio respiratório, causando lesões teciduais. Desta forma os eosinófilos estão relacionados a várias doenças, incluindo a asma, uma vez que bronco-constricção, produção de muco, alteração da permeabilidade vascular e promoção da infiltração eosinofílica e neutrofílica são causadas por mediadores lipídicos dos eosinófilos. Além disso as IL-3 e IL-5 promovem a amplificação da resposta dos eosinófilos na asma, a eosinofilia tecidual juntamente com a eosinofilia em sangue periférico caracterizam inflamação alérgica e asma (PELAIA et al., 2020; SANTOS et al., 2020).

Os efeitos imediatos destas substâncias são extravasamento de plasma, edema, hipertrofia e ou hiperplasia da musculatura lisa, perda da integridade do epitélio brônquico; secreção de muco, hiper-responsividade e consequente estreitamento das vias aéreas inferiores, como pode ser visualizado na figura 1. Geralmente com o cessar da crise e uso de corticoterapia inalatória e ou sistêmica o dano é reversível, embora em alguns pacientes a obstrução brônquica pode ser irreversível e promover o comprometimento da função pulmonar (KUSCHNIR et al., 2016; GLOBAL ASTHMA NETWORK THE GLOBAL ASTHMA REPORT, 2018).

Outra população celular presentes na inflamação asmática são os macrófagos. Estas células se originam a partir de monócitos que migram da circulação sanguínea para os tecidos e estão associados a processos infecciosos e inflamatórios como a asma (BAIN, 2016). Estas células constituem cerca de 7% das células dos pulmões e se dividem em macrófagos intersticiais e macrófagos alveolares (SHARMA et al., 2018) atuando na imunidade inata e desempenhando papel na renovação e regeneração tecidual (KULKARNI et al., 2018). Os macrófagos alveolares são encontrados na luz dos alvéolos e, independente da sua origem, são responsáveis pelo mecanismo de defesa inato (BALHARA, 2012; FRICKER, 2017) e desempenham papel de ativação e supressão da inflamação (KULKARNI et al., 2018). Em indivíduos com asma os macrófagos alveolares são classificados em M1 e M2 dependendo da sua função; macrófagos M1, classicamente ativados estão relacionados a resposta imunológica inata e aos linfócitos Th1, liberação de lipo-polissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral (TNF) - α e interferon (IFN) - γ , liberam interleucinas e quimiocinas inflamatórias, são responsáveis pela imunidade contra patógenos intracelulares e tumores. Já os macrófagos M2, ativados alternativamente, são responsáveis pela destruição de parasitas, possuem alta atividade fagocítica, facilitam a resposta imunológica Th2 e a secreção de citocinas (IL-4 e IL-13) que regulam o processo inflamatório e estimulam o reparo tecidual das vias aéreas (MONIUSZKO et al., 2007; YANG et al. 2012; FRICKER, 2017; DRAIJER et al., 2018; KULKARNI et al., 2018).

FIGURA 1: Cascata inflamatória da asma.



Legenda: O alérgeno inalado é processado pelas células dendríticas e apresentado para as células Th0 CD4⁺. As células B são estimuladas pelas células Th0 CD4⁺ e pelas células T natural killer (NKT) a produzirem IgE. A IgE é secretada, liga-se aos mastócitos pulmonares, o qual degranula pela estimulação da IgE. O mastócito libera os mediadores da resposta imediata e da resposta tardia. Ocorre diapedese das células inflamatórias, liberação de citocinas e consequente hiper-responsividade dos brônquios e broncoespasmo.

Fonte: O autor (2022), criado com BioRender.com

2.3 CLASSIFICAÇÃO DO CONTROLE DA ASMA

Questionários validados e padronizados como o do GINA, Questionário de Controle da Asma (ACQ) (LEITE et al., 2008) e o Teste de Controle da Asma (ACT) (SCHATZ et al., 2009) são aplicados para avaliar os sintomas nas últimas quatro semanas (OLIVEIRA et al., 2016; PIZZICHINI et al., 2020; REDDEL et al., 2022).

Estes questionários possibilitam classificar o controle da asma, conforme a padronização do questionário escolhido.

A avaliação e classificação do controle da asma pode ser dado pela aplicação do questionário ACT (*Asthma Control Test*), o qual foi validado em

português para uso no Brasil por Roxo et al., (2010) e validado para crianças menores de 12 anos por Oliveira *et al.*, (2016). O teste reflete as condições do paciente nas últimas quatro semanas e é composto por sete perguntas sobre os sintomas, uso de medicação de alívio e efeito da asma nas atividades diárias. Estas perguntas têm pontuação que vão de 5 a 25 pontos, sendo que o controle total da asma ocorre quando a pontuação for 25, ou seja, pontuação máxima para todas as respostas. Pontuação entre 20 e 25 considera-se asma controlada e abaixo de 20 pontos é considerado um quadro de asma não controlada (ROXO et al., 2010; SCHOETTLER N., 2020).

2.4 CITOLOGIA DO ESCARRO INDUZIDO

Em crianças, a investigação de doenças respiratórias é realizada pela anamnese dos sintomas clínicos, avaliação clínica, exames de imagem associados aos testes da função pulmonar como espirometria ou pico de fluxo expiratório (PFE), os quais evidenciam a presença de obstrução das vias aéreas, auxiliando no diagnóstico e monitorando o controle da doença (FLEMING et al., 2012).

Os testes que avaliam diretamente a inflamação das vias aéreas são pouco usados na clínica. A medida do óxido nítrico no ar exalado (FeNO), a análise do ar exalado condensado e o exame de citologia de escarro induzido, são métodos menos invasivos (MORITZ et al., 2008), diferentemente da fibrobroncoscopia, utilizada para obter lavado bronco alveolar e/ou espécimes de tecido brônquico. Neste contexto, a citologia de escarro é considerada o padrão ouro para investigação do processo inflamatório do trato respiratório de pacientes com asma (KOLOSKOVA et al., 2017).

O teste de citologia de escarro é conhecido há mais de 60 anos, entretanto nas últimas décadas a técnica foi aprimorada, padronizada de forma segura, minimamente invasiva, fácil de executar e reprodutível, desta forma passou a ser utilizada em pesquisas das doenças das vias aéreas (GONÇALVES et al., 2014; MORITZ et al., 2008) contribuindo para a identificação de fenótipos e endótipos de asma em adultos e crianças, e os marcadores inflamatórios correspondentes,

fornecendo informações que podem ser úteis para o prognóstico e tratamento da doença em prática clínica de rotina (REIS & MACHADO, 2017).

O conhecimento do processo inflamatório das vias aéreas pode direcionar o tratamento e assim evitar a exposição do paciente às altas doses de corticoide desnecessariamente, causando efeitos colaterais significativos (LA SCALA, 2005).

A técnica de indução e análise da citologia de escarro induzido foi padronizado e validada para uso na pediatria com crianças entre 6 e 17 anos independente da gravidade da asma (MOELLER et al., 2015), fato que influenciou de forma positiva o acompanhamento e o tratamento da doença, resultando em diminuição nos episódios de exacerbação e conseqüente necessidade de intervenções hospitalares aos pacientes acometidos por asma moderada e grave, pois o conhecimento da celularidade do escarro induzido permite identificar a ausência ou presença de inflamação e classificá-la em eosinofílica, neutrofílica ou mista (MORITZ et al., 2008).

Cai Y. *et al.*, (1998), em seu estudo, foram os primeiros a comparar os resultados da citologia de escarro induzido de crianças saudáveis, atópicas e não atópicas com crianças asmáticas assintomáticas, sintomáticas e em exacerbação. Os resultados obtidos demonstraram maior contagem celular total, maior percentagem de eosinófilos e de células do epitélio brônquico nos pacientes com asma em exacerbação, em relação aos demais grupos. Entre as crianças saudáveis houve predomínio de macrófagos, de acordo com a normalidade celular do aparelho respiratório saudável (CAI *et al.*, 1998).

Na busca em estabelecer padrões de inflamação Lex e colaboradores consideraram resultados de eosinófilos $>2,5\%$ e neutrófilos $\leq 54\%$, como padrão eosinofílico da inflamação; eosinófilos $\leq 2,5\%$, neutrófilos $>54\%$, caracterizou o padrão neutrofílico; eosinófilos $>2,5\%$ e neutrófilos $>54\%$, padrão misto e eosinófilos $<2,5\%$ e neutrófilos $<54\%$ padrão paucigranulocítico (LEX et al., 2005).

No Brasil, Palomino *et al.*, 2005 avaliaram a citologia de escarro de 96 crianças atendidas pelo Ambulatório de Pneumologia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Neste estudo os pacientes foram agrupados de acordo com a

gravidade da asma (leve, moderada, grave e exacerbação asmática), demonstrando que a contagem celular total foi maior no grupo com asma em exacerbação, seguida da maior percentagem de neutrófilos também neste grupo. Enquanto a maior percentagem de eosinófilos foi descrita em pacientes com asma grave, os pacientes com asma leve apresentaram maior percentagem de macrófagos (PALOMINO *et al.*, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional, analítico, do tipo transversal com coleta prospectiva de dados e de espécimes biológico.

3.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, junto ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da referida Universidade e os espécimes obtidos no Serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica do Complexo Hospital de Clínicas - UFPR. Este serviço, atualmente atende aproximadamente 15 crianças por dia útil com diagnóstico de asma. O CHC-UFPR é referência nacional no atendimento aos pacientes com fibrose cística, imunodeficiências primárias; asma grave; angioedema hereditário; doenças alérgicas por pólen; além de desenvolver estudos clínicos e epidemiológicos nas áreas citadas.

Este estudo foi desenvolvido no período de outubro de 2019 a outubro 2021, assim como a coleta de dados de prontuário. A colheita de amostras biológicas ocorreu no período de setembro de 2019 a março 2020, devido a paralização das atividades pela pandemia do novo Coronavírus.

3.3 POPULAÇÃO ALVO

A população pediátrica com diagnóstico de asma assistidas pelo Serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica do Complexo Hospital de Clínicas – UFPR e demais centros que oferecem este atendimento no país.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas no estudo crianças com diagnóstico de asma determinado por médico pneumologista, cujos responsáveis legais concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas as crianças cujos responsáveis legais retiraram a autorização de participação, e/ou crianças cuja coleta de escarro não foi adequada (pouca secreção ou dificuldade para expelir o escarro) (Figura 2). As amostras coletadas adequadamente, mas que na análise citológica, apresentavam viabilidade celular inferior a 50% (Figura 3), ou ainda contagem diferencial com mais de 20% de células epiteliais escamosas (Figura 4). Não foram excluídas crianças que relataram exacerbação recente.

3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Considerando os critérios de inclusão, a população recrutada foi composta por 60 crianças com diagnóstico prévio de asma.

E considerando os critérios de exclusão, a população de estudada foi composta por 42 participantes.

3.7 TÉCNICA DE AMOSTRAGEM

As 60 crianças avaliadas foram selecionadas de modo não probabilístico e de forma sistemática. Os pacientes com diagnóstico de asma foram convidados a participar deste estudo ao chegarem para consulta nos ambulatórios do CHC-UFPR, SAM 2 e SAM 3.

Após receberem toda explicação da pesquisa e os responsáveis assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), uma data era

agendada para que comparecessem ao Serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica do CHC-UFPR, localizado na Rua Padre Camargo, 543, para a avaliação clínica e do controle da asma, indução e coleta do escarro.

3.8 VARIÁVEIS E PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

a) Avaliação Clínica e Avaliação da Atopia

Como primeiro passo era realizada a avaliação clínica, pelos médicos do serviço, com exame físico e medida de dados antropométricos e dados vitais.

Dados clínicos pregressos dos participantes em relação ao tempo de diagnóstico, medicações em uso, comorbidades, doenças alérgicas associadas e exames radiológicos foram coletados dos prontuários e anotados em uma ficha de avaliação confeccionada para esta finalidade.

Ainda nos prontuários foram obtidos valores de contagem absoluta de eosinófilos em sangue periférico (realizada no Setor de Hematologia do CHC-UFPR) e da dosagem de IgE total (realizada no Setor de Imunoquímica do CHC-UFPR) por meio de automação. Foram considerados alterados hemogramas com eosinófilos acima de $400 \times 10^3/\mu\text{L}$ e dosagem de IgE total acima de 100 UI/mL, conforme valores de referência utilizados pelo Laboratório de análises Clínicas do CHC UFPR. Para estas análises buscou-se os resultados coletados no máximo há um ano à data da indução do escarro, para posteriormente estabelecer uma associação fidedigna com os achados da citologia do escarro.

Detalhes do Teste Cutâneo Alérgico (TCA) por puntura foram obtidos do prontuário do paciente. O TCA é realizado de rotina no serviço e os alérgenos testados incluem: Controle positivo (histamina); *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Blomia tropicalis*; *Blatella germânica*; *Canis familiaris*; *Felis domesticus*; *Lolium multiflorum* e controle negativo (soro fisiológica 0,9%). O teste foi considerado positivo quando a pápula apresentava diâmetro superior a 3 mm comparada ao controle negativo (DORTAS et al., 2013).

b) Avaliação do Controle da Asma

Após a avaliação clínica, o participante, acompanhado pelo responsável, foi submetido ao *Asthma Control Test* (ACT, Teste de Controle da Asma) validado em português para uso no Brasil por (ROXO et al., 2010).

Para aplicação deste questionário utilizou-se uma sala do Serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica do CHC-UFPR, sendo aplicado de forma individual por um dos pesquisadores. No questionário ACT validado para crianças de 4 a 12 anos, quatro perguntas eram feitas diretamente as crianças, com ilustrações para facilitar a interpretação pela criança, e 3 perguntas eram feitas ao responsável cuidador (apêndice 2).

c) Indução do escarro

Em uma sala própria para manipulação de material biológico (colheitas sanguíneas, aplicação de imunobiológicos) do Serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica do CHC-UFPR, as crianças avaliadas foram submetidas à indução do escarro de acordo com o método desenvolvido por Pizzichini *et al.*, (1996), o qual foi modificado pelo serviço e executado por uma profissional fisioterapeuta treinada. Todas as induções foram realizadas pela mesma profissional e acompanhada por médico especialista do serviço.

Para a indução do escarro, o participante sentado em uma cadeira, realizou inalações de soluções salinas hipertônicas. Inicialmente solução salina a 3%, e caso não houvesse resposta na produção de secreção, aumentava-se as concentrações de maneira seriada para 4% e após 5%. Para tal, utilizou-se nebulizador de membrana ativa (tecnologia *Mesh*, Nebzmart, marca Glenmark, 2018). Cada nebulização durava aproximadamente sete minutos e ao final de cada uma, o participante era orientado a enxaguar a boca, deglutir água, assoar o nariz para diminuir a contaminação por saliva ou descarga pós nasal e instruído a tossir e depositar o escarro em recipiente limpo e estéril que foi mantido em geladeira por no máximo duas horas (DREWS et al., 2006; GONÇALVES et al., 2014; PALOMINO et al., 2005).

Buscava-se no mínimo um espécime com volume de 0,5 mL de escarro, sendo que, para tal as nebulizações seriadas chegaram a durar até 21 minutos (três nebulizações). Após as três nebulizações, se não houvesse sucesso na indução do escarro, ou a criança relatasse desconforto respiratório o processo era interrompido.

A percepção de desconforto respiratório e/ou a ausculta de sibilância foram considerados como critérios para suspensão do procedimento de indução. Após suspensão do procedimento de indução, nos casos de desconforto respiratório, foi administrado 400 µg de salbutamol, aerossol, com espaçador e máscara. O exame também foi encerrado quando um espécime adequado de escarro foi obtido (0,5 mL) (DREWS et al., 2006; GONÇALVES et al., 2014; PALOMINO et al., 2005), (Figura 2).

Todos os procedimentos foram acompanhados por um médico do serviço, com a avaliação clínica periódica durante toda a indução do escarro.

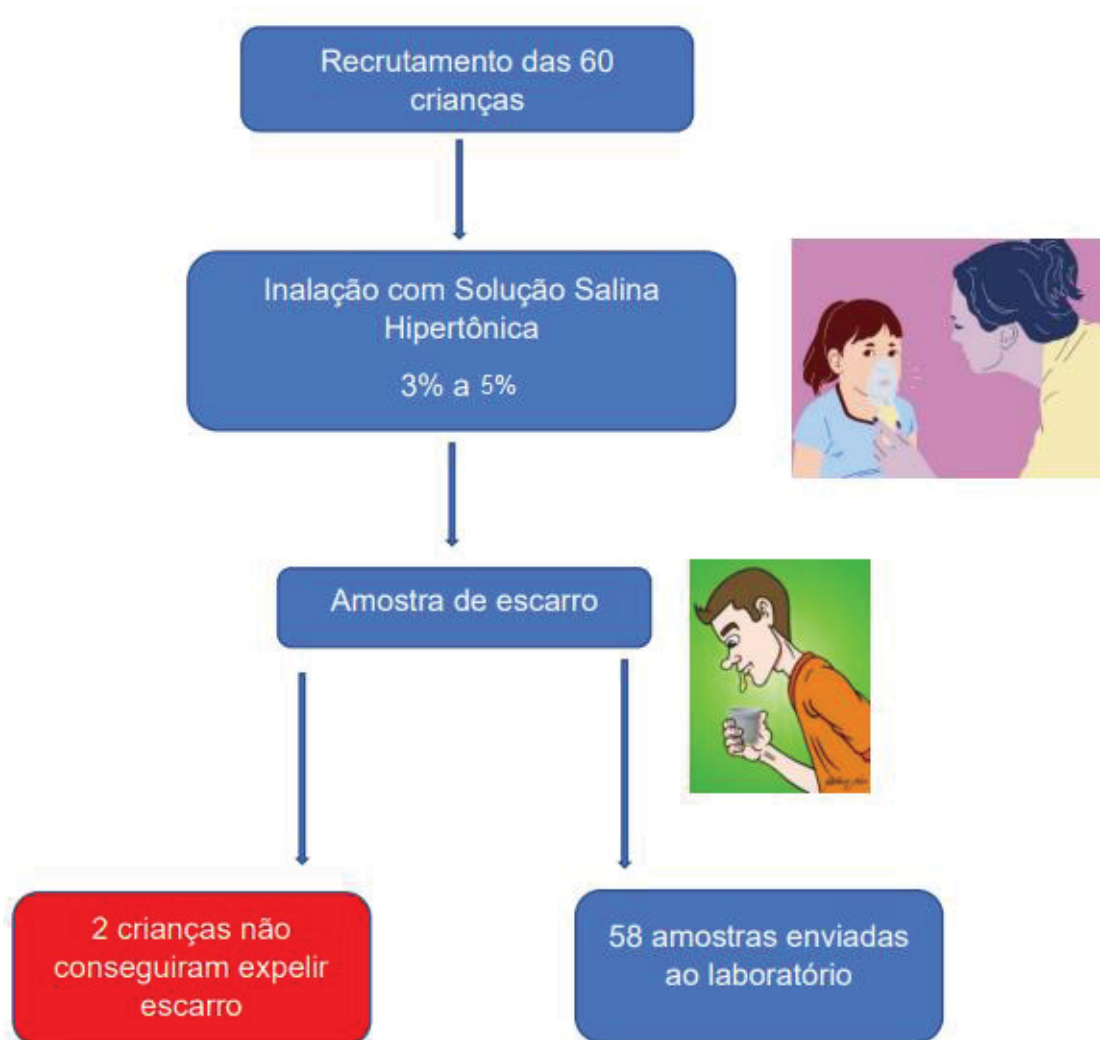
d) Exame do escarro

Após a coleta os espécimes foram encaminhadas ao setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas do CHC-UFPR, o processamento dos espécimes foi realizado e analisado por uma única profissional farmacêutica bioquímica, a qual foi treinada pelo Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina, (NUPAIVA – HU – UFSC), de acordo com método desenvolvido por (PIZZICHINI et al., 1996). As amostras de escarro foram processadas em até duas horas após a coleta. De acordo com as normas preconizadas pelo método, o processamento da amostra iniciou com a separação de *plugs* presentes na amostra em quantidade de aproximadamente 100mg. Após esta separação foi adicionado ditiotretol (dt) para fluidificar a amostra e em seguida acrescentou-se tampão Salina-Fosfato (PBS) pH 7,4. Então a amostra foi filtrada em filtro de nylon 50 µm para retirada de *debris*, passando por nova pesagem seguida de centrifugação 3200 rpm por 10 minutos e o *pellet* ressuspensão em 200 – 600µL de tampão por (PIZZICHINI et al., 1996).

Deste volume aproximadamente 100 μ L foram utilizados para confeccionar as lâminas em cito-centrifuga e posteriormente coradas pela coloração de *May-Grunwald-Giemsa*. A contagem em câmara de Neubauer modificada foi realizada pela diluição 1:1 de amostra ressuspendida em PBS, com corante azul de trypan, o qual possui a capacidade de corar o núcleo das células mortas através da penetração do corante pelos poros da membrana nuclear, possibilitando a determinação da viabilidade celular do material. O somatório das células integras determinou o número total de células da amostra e a partir do total, o cálculo da porcentagem de células viáveis foi realizado. Na lâmina corada foram analisadas as características celulares (porcentagem de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos e células escamosas), em 400 células contadas (PIZZICHINI et al., 1996).

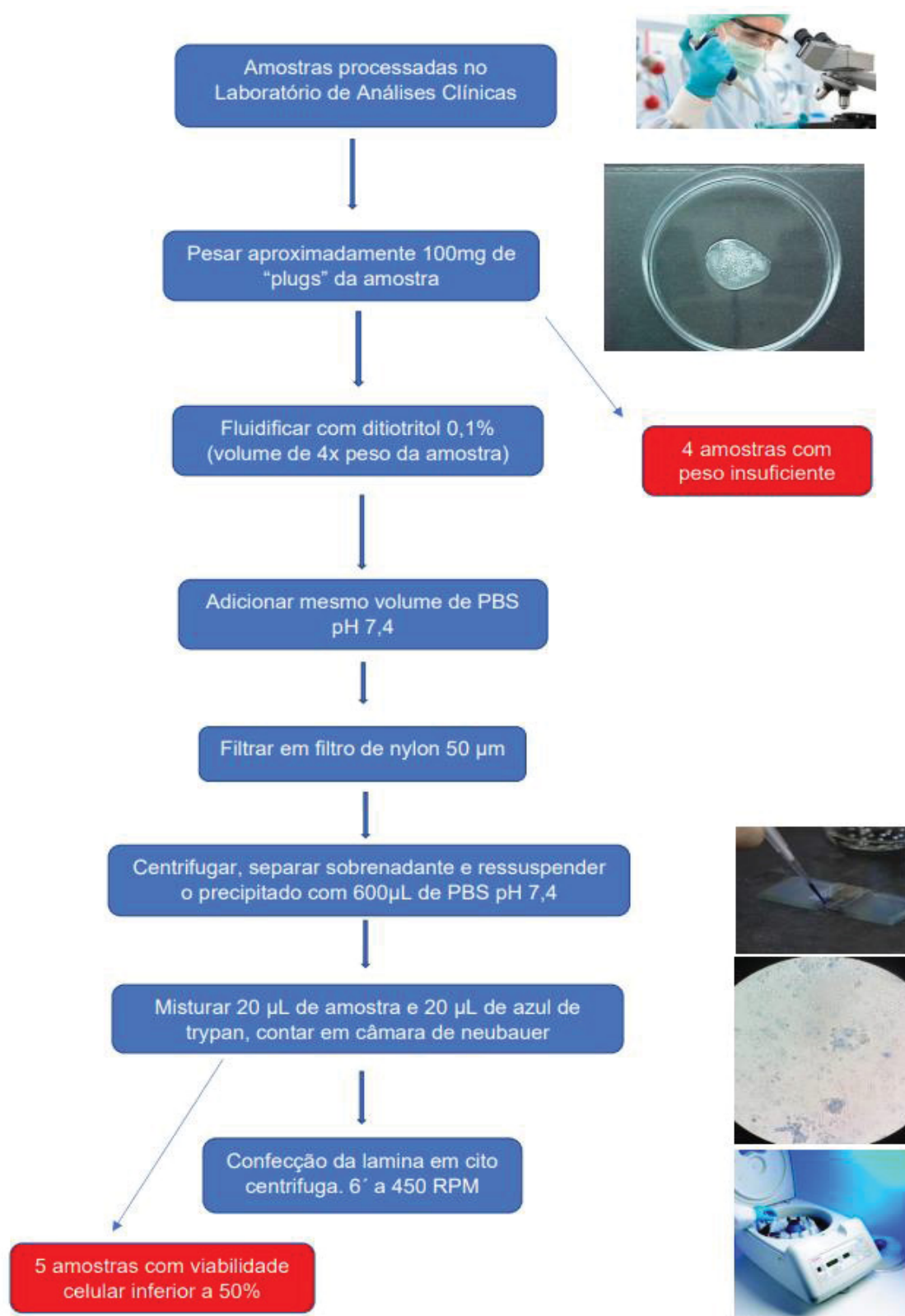
O espécime foi considerado adequado quando houve pouca contaminação por saliva (< 20% de células escamosas); viabilidade celular superior a 50%, visualizada em uma câmara de Neubauer (hemocitômetro) e possibilidade de analisar pelo menos 400 células (DREWS et al., 2006), conforme demonstrado nas figuras 3 e 4.

FIGURA 2: Fluxograma da indução e colheita de escarro e frequência de espécimes de escarro obtidas.



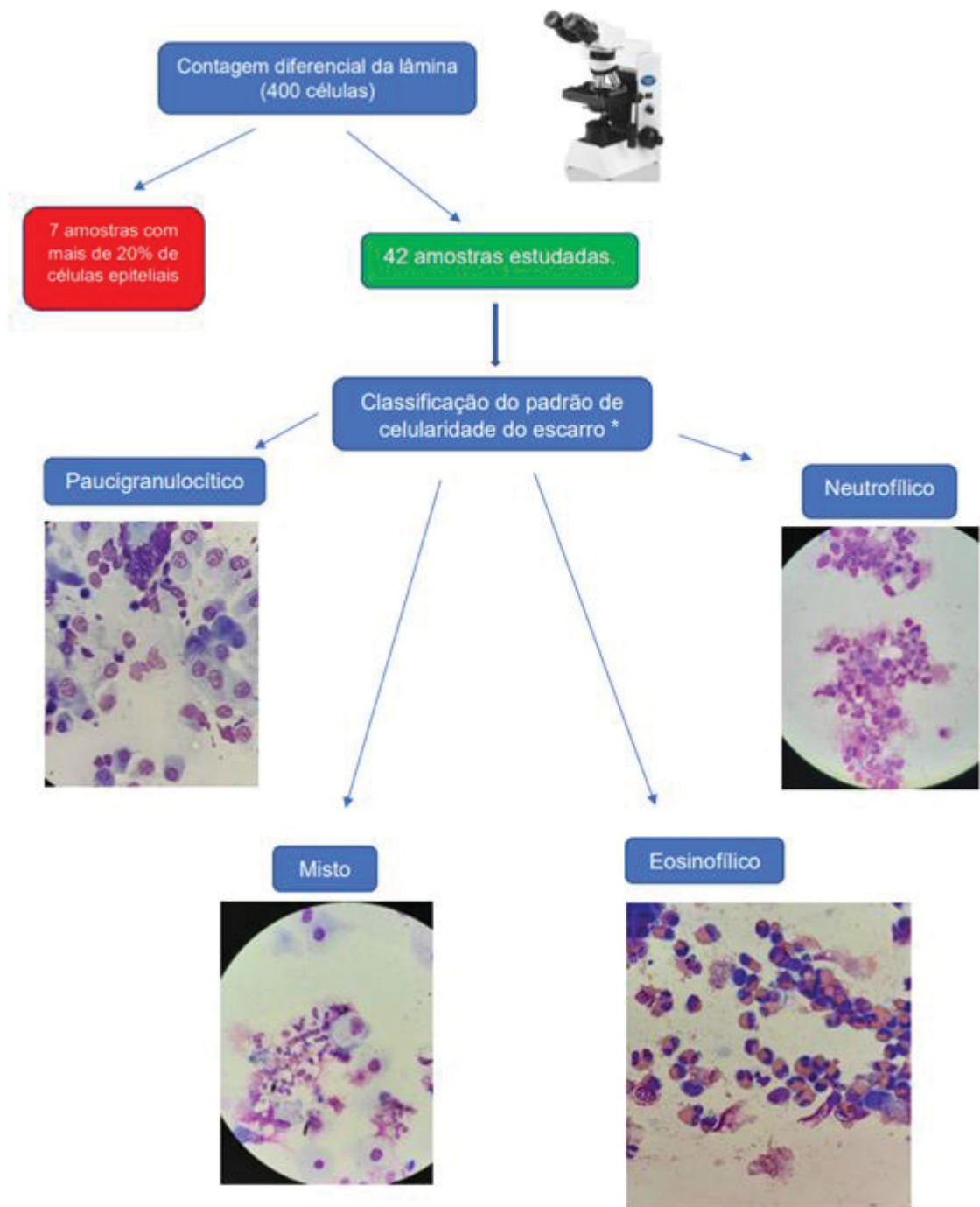
Fonte: O autor, (2021)

FIGURA 3: Fluxograma do processamento dos espécimes.



FONTE: O autor, (2021).

FIGURA 4: Fluxograma da leitura da lâmina e classificação do padrão celular do escarro.



Legenda: * Lex et al. (2005).

FONTE: O autor, (2021).

3.9 TABULAÇÃO E GERENCIAMENTO DE DADOS

Todos os dados dos pacientes que constituíram o grupo com asma controlada e o grupo com asma não controlada foram coletados e registrados exclusivamente pelo pesquisador, imediatamente após a avaliação clínica e aplicação do questionário ACT. Posteriormente foram digitados em planilha eletrônica Microsoft office Excel, juntamente com os resultados do exame laboratorial de citologia de escarro, contagem de eosinófilo em sangue periférico e dosagem de IgE, após conferidos foram exportados para o *software* de estatística Software R versão 4.0.5, de propriedade da empresa *Smart Stat Analysis*.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise descritiva, as variáveis contínuas foram expressas em termos de medidas por medidas de tendência central, Média e mediana. Medidas de variação, desvio padrão e intervalos interquartis, enquanto as variáveis categóricas foram expressas em termos de frequências e porcentagens.

Para a comparação dos dois grupos nas variáveis contínuas foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para as variáveis que não seguiam distribuição normal (teste de Anderson-Darling) e eram homogêneas (teste de Bartlett). Nas variáveis categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher.

O nível de significância adotado nos testes foi de 0,05. Foram consideradas hipóteses bicaudais. Além disso, os intervalos de confiança construídos foram de 95%.

O software R versão 4.0.2 foi utilizado para a realização de todas as análises.

3.11 ÉTICA EM PESQUISA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP-SH) do CHC UFPR, em reunião realizada no dia 19 de outubro de 2019, sob registro 3.648.296/ 2019 (apêndice 1).

Os pais ou responsáveis pela criança foram informados de forma clara e detalhada sobre os objetivos do estudo, benefícios e riscos esperados, e o caráter voluntário da participação, bem como deixado aberta a possibilidade de recusar a participação da criança no decorrer do estudo e consentiram através da assinatura do TCLE.

3.12 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada considerando as medidas de proteção, minimização de riscos, confidencialidade, responsabilidade do pesquisador e da instituição, de acordo com o compromisso firmado com o Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná na ocasião de submissão do projeto.

3.13 LIMITAÇÕES DA PESQUISA

No início da pesquisa o número previsto de amostra incluídas era de 94 crianças, considerando erro de 5% e nível de confiança de 95%. Entretanto, com o início da pandemia do novo coronavírus, no ano de 2020 e 2021, as coletas foram suspensas no dia 18 de março de 2020, com 60 crianças avaliadas e 58 amostras coletadas.

Além disso, ao buscar os resultados de exames de hemograma para contagem absoluta de eosinófilos no sangue periférico e dosagem de IgE sérica em prontuário, foi observado que havia exames solicitados, porém não coletados pelos participantes, o que prejudicou algumas associações de variáveis analisadas.

3.14 FOMENTO PARA PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS

Esta pesquisa não recebeu fomento de instituição financiadora, entretanto contou com o apoio e participação do Serviço de Alergia e Pneumologia Pediátrica do CHC UFPR, com profissionais capacitados e equipamentos de nebulização para coleta do escarro induzido. Também contou com apoio do Laboratório de Hematologia/ Líquidos e Líquor do CHC UFPR, com material de laboratório e profissional capacitado para realização da análise citológica do escarro induzido.

4. RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA ATOPIA

A amostra final foi composta por 42 espécimes de escarro viáveis para análise da citologia, todas de crianças asmáticas, acompanhadas no ambulatório de Pneumologia Pediátrica do CHC-UFPR.

Vinte e oito participantes (66,7%) do sexo masculino; a média de idade do grupo foi de 8,4 ($\pm 1,9$) anos. Vinte e seis participantes (61,9%) residiam na cidade de Curitiba, oito (19,5%) residiam na região metropolitana e oito (19,5%) residiam em cidades do interior do estado do Paraná.

Quando questionado se havia diagnóstico de asma na família, 23 (54,8%) responderam que sim, o grau de parentesco e frequência foi classificado em pais e/ou irmão, avós, tios e/ou primos, conforme descrito na tabela 1.

A primeira crise de sibilância ocorreu na mediana de idade de 24 meses (9,25 – 48,0). O relato de exacerbação de asma superior a duas vezes por ano foi descrito por 32 participantes (76,2%), sendo que igual número precisou de atendimento de emergência. Dezesesseis (38,1%) precisaram de internação e 5 (11,1%) apresentaram exacerbações graves com necessitaram de admissão em unidade de terapia intensiva (UTI).

Todas as crianças incluídas no estudo estavam fazendo uso de tratamento para controle da asma, sendo que 28 crianças (66,7%) faziam uso de corticoides inalatório e/ou sistêmico e 14 (33,3%) utilizavam outros medicamentos não pertencente a classe de esteroides. O uso de outras de medicamentos de manutenção para outras doenças não respiratórias foram descritas por oito crianças (19,1%).

Entre os participantes que usavam corticoide inalatório (28/42), 7 (25%) precisaram de internação e 21 (75%) não precisaram ficar em hospital para manejar a exacerbação. O número de internações entre os participantes tratados com corticoide inalatório teve mediana e intervalo interquartil de 0 (0,0-0,25), enquanto os pacientes não tratados com corticoide apresentaram mediana e intervalo interquartil de 1,5 (0,0-5,0).

Desta forma o uso de corticoide inalatórios foi estatisticamente significativo quando comparado a necessidade de internação hospitalar, $p=0,02$ (Teste Exato de Fischer) e a quantidade de internação dos pacientes tratados, $p=0,019$ (Teste de Mann-Whitney).

Dezenove participantes coletaram sangue total para hemograma, exame que permite quantificar eosinófilos circulantes; e 17 coletaram sangue para dosagem de IgE no soro. Os 19 espécimes de sangue total, tiveram mediana da contagem de eosinófilos absoluta de $577,0/\mu\text{L}$, enquanto a dosagem de IgE sérica dos 17 pacientes que realizaram este exame teve mediana de $810,0\text{UI/mL}$, conforme descrito na tabela 1.

O Teste Cutâneo Alérgico foi realizado em todos os pacientes estudados, com resultado positivo em 33 (78,6%) dos pacientes, para ao menos um dos alérgenos testados.

TABELA 1: Características sociodemográficas e de atopia do grupo de estudo.

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA, MÉDIA E MEDIANA
Sexo - Masculino	28 (66,6) #
Idade (anos) ± DP	8,4 (±1,9) *
Residência	
• Curitiba	26 (61,9) #
• Região metropolitana	8 (19,1) #
• Interior do Paraná	8 (19,1) #
Comorbidade	
• Conjuntivite	12 (28,6) #
• DA	10 (23,8) #
• Rinite	40 (95,2) #
Asma Família	
• Pais e/ou irmãos	23 (54,8) #
• Avós	16 (69,6) #
• Tios e/ou primos	05 (21,7) #
Teste Cutâneo Positivo	33 (78,6) #
Eosinófilos/uL em SP	577,0 (355,0 - 1300,0) **
IgE UI/mL em SP	810,0 (337,0 - 2707,5) **
Idade da 1º crise (meses)	24 (9,3 – 48) **
Exacerbações no último ano	
• >2x no ano	32 (76,2) #
• Emergência	32 (76,2) #
• Internação	16 (38,1) #
• UTI	5 (11,1) #

Legenda: *: Média (Desvio padrão). **: Mediana (intervalo interquartil).

#: N (frequência %). SP: sangue periférico.

Fonte: O autor, (2021).

4.2 CONTROLE DA ASMA

De acordo com questionário ACT, que avalia o controle da asma nas últimas quatro semanas, 26 pacientes (61,9%) estavam com a asma controlada e 16 (38,1%).

Buscou-se a associação do controle da asma com variáveis clínicas, epidemiológicas e dados de tratamento. Na análise dos grupos asma controlada e não controlada, foi observado que o grupo com controle da asma teve média de pontuação do ACT de $23,6 \pm 2,00$, média de idade de $8,5 \pm 1,96$ anos e a primeira crise de asma com mediana de 24 (12 – 48) meses de vida da criança. O número de atendimento de emergência superior a 2 vezes ao ano, relatada por 19 (73,1%) dos participantes, enquanto eventos que precisaram internação foi descrita por sete (26,9%) e 1(3,9%) precisou ser internado e conseqüentemente transferido para UTI. O histórico de asma na família foi relatado por 15 (57,7%), o predomínio de parentesco foi pais e/ou irmão, a convivência com familiar fumante foi descrita por 2 (11,1%) participantes.

Por sua vez, o grupo com asma não controlada apresentou média de pontuação do ACT de $14,9 \pm 3,9$, média de idade de $8,2 \pm 2,04$, sendo que neste grupo a primeira crise de asma ocorreu numa mediana de 12 (5,25 - 27) meses. O número de atendimento de emergência superior a 2 vezes ao ano, relatado por 13 (81,3%), mediana de internação, descrito por nove (56,3%) participantes e 4 (25,0%) precisaram de UTI. Relatos de casos de asma na família ocorreram em 8 (50,0%), também com predomínio entre pais e/ou irmãos.

Ao comparar os grupos, observou-se que a idade da primeira crise de asma foi significativamente menor no grupo de asma não controlada e a dosagem de IgE [$1295,8$ ($410,4$ - $2369,3$) UI/mL] e a contagem de eosinófilos [$958,5$ ($396,5$ - $1381,25$) / μ L] em sangue periférico foi significativamente maior no grupo com asma não controlada. A necessidade de internação em UTI demonstrou uma tendência de ser mais frequente no grupo com asma não controlada. As demais variáveis não apresentaram diferença (tabela 2).

TABELA 2: Associação entre asma controlada e não controlada com variáveis clínicas, epidemiológicas e dados de tratamento.

VARIÁVEIS	CONTROLE DA ASMA		VALOR DE P
	Controlada 26 (61,9%)	Não Controlada 16 (38,1%)	
Idade (anos) ± DP	8,5 (±1,9) *	8,2 (±2,0) *	0,563 ^a
Idade 1º crise (meses)	24 (12 – 48) **	12 (5,25 – 27,0) **	0,05 ^b
Comorbidades			
• Conjuntivite	6 (23,1%) #	6 (37,5%) #	0,483 ^a
• DA	4 (15,4%) #	6 (37,5%) #	0,142 ^a
• Rinite	25(96,2%) #	15(93,8%) #	1,0 ^a
Teste Cutâneo positivo	19 (73,2%) #	14 (87,5%) #	0,442 ^a
Eosinófilos/uL em SP	512,0 (355,0-846,5) **	958,5 (396,5-1381,25) **	< 0,001 ^b
IgE UI/mL em SP	764,9 (200,2-2578,8) **	1295,8 (410,4-2369,3) **	< 0,001 ^b
Exacerbações			
• >2x no ano e emergência	19 (73,1%) #	13 (81,3%) #	0,715 ^b
• Internação	7 (26,9%) #	9 (56,3%) #	0,101 ^b
• UTI	1 (4,0%) #	4 (25,0%) #	0,061 ^b
Em uso de corticoide inalatório	19 (73,1%) #	9 (56,3%) #	0,322 ^b

Legenda: a: Teste de Fisher. b: Teste de Mann-Whitney. *: Média (Desvio padrão). **: Mediana (intervalo interquartil). #: N(frequência). SP: sangue periférico. Asma controlada - ACT≥20. Asma não controlada – ACT < 20.

Fonte: O autor, (2021).

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA DE ESCARRO

Dos 58 espécimes de escarro encaminhadas ao laboratório para análise da citologia, 16 foram excluídas do estudo. Quatro espécimes eram insuficientes para realizar o exame, cinco tiveram viabilidade celular inferior a 50% e sete espécimes eram compostos por mais 20% de células epiteliais escamosas, na contagem diferencial.

O resultado do exame de citologia de escarro induzido das 42 amostras avaliadas, foram descritos em mediana e intervalo interquartil, na tabela 3.

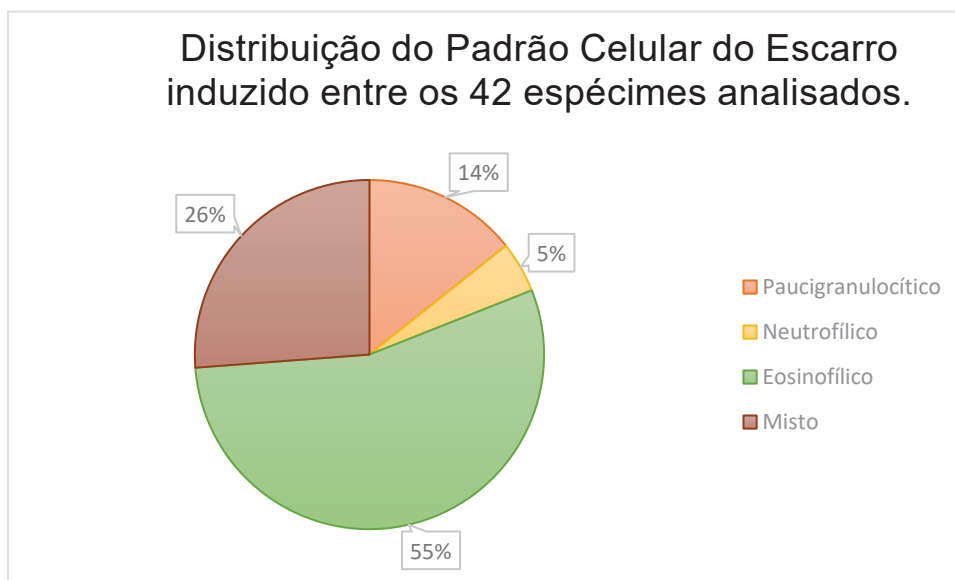
TABELA 3: Resultado da citologia de escarro das 42 amostras estudadas.

VARIÁVEIS	MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL)
Células/mL de escarro	2,8 (1,11 – 7,80)
Viabilidade celular (%)	79,0 (67,0 – 89,0)
Eosinófilos (%)	10,0 (5,0 – 33,0)
Neutrófilos (%)	38,0 (11,25 – 60,0)
Macrófagos (%)	31,0 (10,0 – 51,5)
Linfócitos (%)	3,0 (0,25 – 6,75)
Células epiteliais (%)	0,0 (0 – 0)

Fonte: O autor, (2021).

Nos 42 espécimes estudados, foi determinado o padrão de escarro de acordo com classificação já citada. Houve predomínio do padrão eosinofílico 23 (54,8%), seguido pelo padrão misto 11 (26,2%) conforme descrito no gráfico 1. O padrão de celularidade predominante foi o eosinofílico, independente da asma estar controlada, ou não controlada.

GRÁFICO 1: Distribuição dos padrões de escarro nos espécimes estudados.



Legenda: Padrão eosinofílico: {eosinófilos \geq 2,5% e neutrófilos $<$ 54%}. Padrão misto: {eosinófilos \geq 2,5% e neutrófilos \geq 54%}. Padrão neutrofilico: {eosinófilos $<$ 2,5% e neutrófilos \geq 54%}. Padrão paucigranulocítico: {eosinófilos $<$ 2,5% e neutrófilos $<$ 54%} Lex *et al.*, 2005.

Fonte O autor, (2021).

Para a análise estatística dos padrões, estes foram agrupados em eosinófilos superior a 2,5 (grupo eosinofílico) (34 amostras), composto pelo padrão eosinofílico e misto; e grupo eosinófilos inferior a 2,5 (grupo não eosinofílico) (08 amostras), formado por paucigranulocítico e neutrofílico.

Desta forma foi possível observar que o relato de asma na família foi positivo para 18 (54,55%) dos participantes do grupo eosinofílico e em 5 (55,56%) grupo não eosinofílico, em ambos os grupos o vínculo de maior frequência foi pais e/ou irmãos com 12 (66,67%) e 4 (80%), respectivamente. Apenas dois participantes de cada grupo relataram ter convívio com pessoa fumante. Rinite e teste cutâneo positivo, foram mais frequentes no grupo classificado eosinofílico (tabela 4).

Foi comparado o padrão da citologia do escarro induzido com os resultados dos exames de sangue realizados, o grupo eosinofílico teve mediana de resultados de eosinófilos absolutos em sangue periférico de 706,6/ μ L (480,8-1344,8) e a dosagem de IgE mediana de 1052,9 (393,9 – 2778,4) UI/mL, nesta associação as dosagens laboratoriais foram significativamente maiores no grupo eosinofílico. Foi verificado a associação entre as variáveis clínicas e de controle da asma e os achados de citologia do escarro, os quais não apresentaram significância estatística nas comparações, conforme descrito na tabela 4.

TABELA 4: Comparação entre os grupos eosinofílico e não eosinofílico com as variáveis clínicas, epidemiológicas e dados de tratamento.

VARIÁVEIS	PADRÃO DO ESCARRO		VALOR DE P
	Grupo Eosinofílico n= 34 (81%)	Grupo não Eosinofílico n= 08 (19%)	
Idade (anos) ± DP	8,7 (±1,8) *	7,3 (±2,2) *	0,087 ^a
Idade 1º crise (meses)	24 (9-48) **	12 (12-36) **	0,547 ^b
Fumante na família	1(8,3) *	2(28,6) *	0,212 ^a
Comorbidades			
• Conjuntivite	6 (18,2) #	6(66,7) #	0,009 ^a
• Da	6 (18,2) #	4(44,4) #	0,181 ^a
• Rinite	31(93,9) #	9(100) #	1,00 ^a
Teste cutâneo positivo	26 (78,8) #	7 (77,8) #	1,00 ^a
Eosinófilos/uL em SP	706,5(480,8-1344,8) **	200,0(190-295) **	< 0,001
IgE UI/mL em SP	1052,9(393,9-2778,4) **	145,5(137,8-1169,0) **	< 0,001
Exacerbações			
• >2x no ano	26 (78,8) #	6 (66,7) #	0,669 ^a
• Emergência	24 (72,7) #	8 (88,9) #	0,416 ^a
• Internação	12 (36,4) #	4 (44,4) #	0,711 ^a
• Uti	4 (12,1) #	1 (11,1) #	1,000 ^a
Em uso de corticoide inalatório	24 (72,7) #	4 (44,44) #	0,133 ^a
Asma controlada	20 (60,6) #	6 (66,7) #	1,000 ^a

Legenda: a: Teste de Fisher. b: Teste de Mann-Whitney. *: Média (± Desvio padrão). **: Mediana (intervalo interquartil). #: N (frequência %). SP: sangue periférico. Grupo eosinofílico: padrão misto e padrão eosinofílico. Grupo não eosinofílico: padrão neutrofílico e padrão paucigranulocítico. Fonte: O autor, (2021).

4.4 ASSOCIAÇÃO DA CELULARIDADE DO ESCARRO COM O CONTROLE DA ASMA

A avaliação da citologia de escarro entre os grupos de asma controlada e não controlada apresentou porcentagem da viabilidade celular teve mediana de 73,5% (66,0- 88,5) grupo controlado e no grupo não controlado foi 80,5% (75,5 – 83,5).

As medianas e o intervalo interquartil da celularidade do escarro no grupo com asma controlada e asma não controlada pode ser contemplado na tabela 5 e na figura 5, onde é possível observar a diferença estatística ($p=0,027$) na mediana de macrófagos quando realizada a comparação dos grupos asma controlada e asma não controlada.

Na pesquisa e contagem de eosinófilos não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos, porém ao avaliar a presença de grânulos eosinofílicos no espaço extracelular, a qual foi classificada em ausente e presente, teve presença significativamente maior no grupo com asma não controlada ($p=0,042$), gráfico 2 e figura 6.

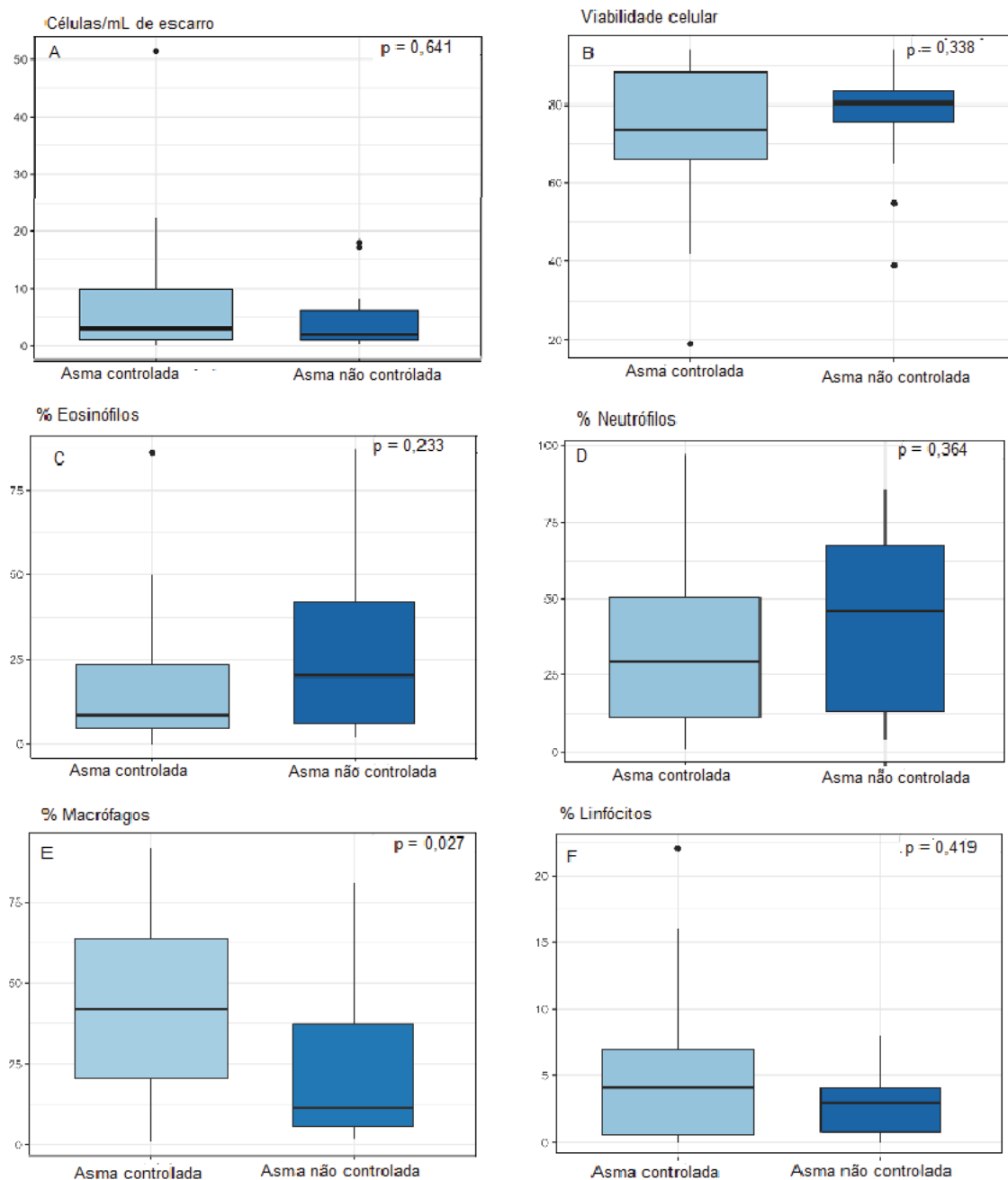
TABELA 5: Resultados da citologia de escarro dos grupos asma controlada e não controlada.

VARIÁVEIS	MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL)		VALOR DE P*
	Asma controlada	Asma não controlada	
Células/mL de escarro	3,0 (1,1-9,9)	2,1 (1,1-6,2)	0,641
Viabilidade celular (%)	73,5 (66,0-88,5)	80,5 (75,5-83,5)	0,338
Eosinófilos (%)	8,5 (4,3-23,3)	20,0 (5,8-42,0)	0,233
Neutrófilos (%)	29,5 (11,3-50,3)	46,0 (13,3-67,3)	0,369
Macrófagos (%)	42,0 (20,3-63,8)	11,5 (5,8-37,3)	<u>0,027</u>
Linfócitos (%)	4,0 (0,5-7,0)	3,0 (0,8-4,0)	0,419

Legenda: * Teste de Mann-Whitney

Fonte: O autor, (2021).

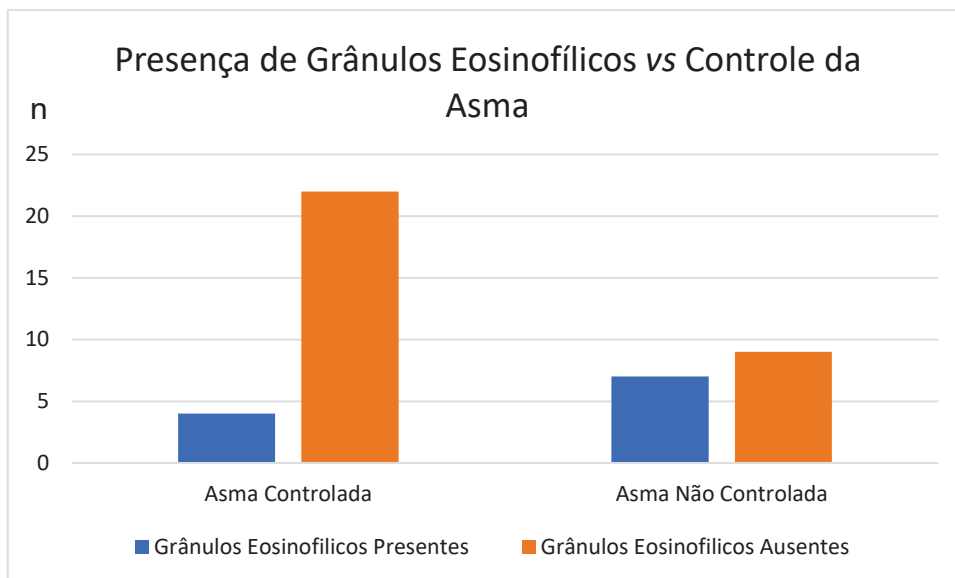
FIGURA 5: Distribuição em percentual de células em asma controlada e asma não controlada.



Legenda: Medianas de: A) Células por mL de escarro, B) Viabilidade celular, C) Eosinófilos, D) Neutrófilos, E) Macrófagos e F) Linfócitos. Percentagem da mediana de células observadas de acordo com o controle da asma. Asma controlada – ACT ≥ 20 , Asma não controlada – ACT < 20 .

Fonte: O autor, (2021).

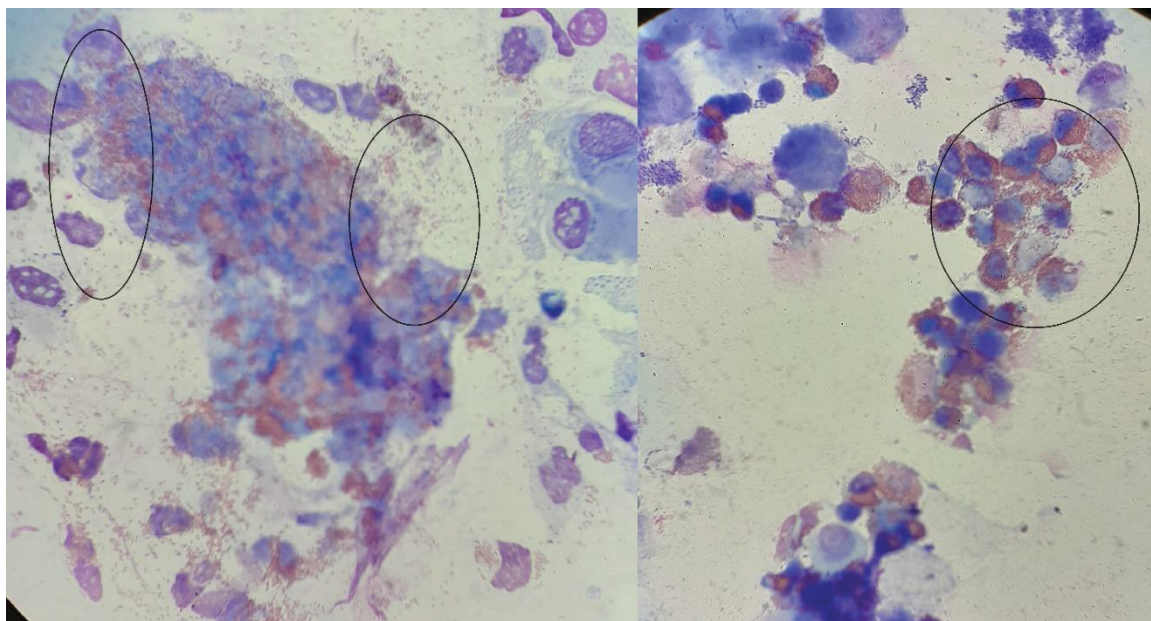
GRÁFICO 2: Presença de grânulos de eosinófilos nas amostras de pacientes com asma controlada e não controlada.



Legenda: Valor de $p=0,042$; Teste exato de Fisher. Asma controlada – ACT ≥ 20 , Asma não controlada – ACT < 20 . Grânulos de eosinófilos presentes: grânulos dispersos para fora do espaço citoplasmático. Grânulos eosinófilos ausentes: grânulos no espaço citoplasmático.

Fonte: O autor, (2021).

FIGURA 6: Ilustração da presença de grânulos de eosinófilos nos espécimes de escarro.



Legenda: Eosinófilos com seus grânulos liberados para o espaço extra-celular.

Fonte: O autor, (2020).

5. DISCUSSÃO

5.1 A INDUÇÃO DO ESCARRO E A VIABILIDADE DO ESPÉCIME

A indução do escarro em crianças com asma apresentou-se viável, segura e não invasiva. Não houve eventos adversos durante o procedimento que necessitassem a interrupção e 70% das amostras foram consideradas adequadas para análise.

As maiores perdas de amostras aconteceram no início do período de coleta, momento no qual a técnica estava em desenvolvimento e, manobras que otimizaram a indução do escarro, estavam sendo aprimoradas.

A indução de escarro em crianças requer treinamento específico e pode levar a intercorrências durante o procedimento, como estímulo de tosse de forte intensidade e, especialmente, acarretar broncoespasmo. Autores como Palomino *et al.* (2005), obtiveram 67% de sucesso na indução escarro de crianças e adolescentes de 6 a 18 anos. Estes autores consideraram o espécime adequado quando, na câmara de Neubauer, foi obtido quantidade igual ou superior a 50% de células vivas e inferior a 80% de células epiteliais escamosas. Chen *et al.* (2013) estudaram população saudável com idade de 5 a 16 anos e obtiveram 59,8% de sucesso na indução do escarro ao excluir da sua amostra os espécimes com contagem superior a 20% de células epiteliais escamosas na contagem diferencial e viabilidade celular inferior a 40%. Enquanto Staticescu *et al.*, (2014) estudaram grupo de 6 a 18 anos com asma, a taxa de sucesso da indução do escarro foi de 82%, considerou espécime adequado, aqueles com ao menos 400 células não escamosas na câmara de Neubauer e excluiu espécimes cuja contagem diferencial maior ou igual a 80% de células epiteliais escamosas, excluindo pacientes com mais de duas exacerbações ao ano e não considerou a viabilidade celular.

Neste estudo a população avaliada era composta por crianças mais jovens, de 5 a 12 anos, com mediana de idade de 8,4 ($\pm 1,97$) anos, o que torna a indução do escarro mais desafiadora. Os critérios adotados para considerar um espécime adequado foi rigoroso quando comparado aos estudos citados, onde os espécimes considerados adequados deviam apresentar uma somatória de

condições, com viabilidade celular superior a 50% e com contagem diferencial de células epiteliais escamosas inferior a 20% conforme descrito por Drews (2006).

A despeito deste rigor, foi obtido 70% de sucesso de recuperação da amostra, demonstrando a eficiência da colheita dos espécimes de escarro.

5.2 DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA ATOPIA.

Sessenta e seis por cento (28/42) dos pacientes que tiveram o escarro avaliado foi do sexo masculino, apontando uma prevalência aumentada de asma neste grupo. Este achado coincide com outros autores, como Palomino et al. (2005) e pode estar relacionado às diferenças anatômicas do sistema respiratório entre os sexos durante a infância, com redução do calibre das vias aéreas no sexo masculino, favorecendo aos quadros de asma mais graves. Tais diferenças se anulam quando os adolescentes atingem a puberdade (BOECHAT et al., 2005), quando os sintomas começam a se tornar mais brandos nos meninos e aumentar nas meninas, devido a ação imunossupressora da testosterona, enquanto o estrogênio aumenta a produção INF-7 por linfócitos NK que participam do processo inflamatório da asma alérgica (FERREIRA et al., 2020).

Neste estudo, a descrição da primeira crise de asma teve mediana de ocorrência aos 24 meses (9,25-48), nesta faixa etária o diagnóstico é clínico e deve ser diferenciado de sibilância desencadeada por infecções virais. Vale ressaltar que a asma de fenótipo alérgico também apresenta a primeira crise antes dos 5 anos de idade e, como já descrita em estudos anteriores, pode ocorrer nos primeiros anos de vida (FONTES et al., 2005). Saldanha *et al.*, 2014 descreveu que a primeira crise de asma ocorre antes dos cinco anos de idade, onde metade da amostra, relatou a primeira crise no primeiro ano de vida.

Aproximadamente metade, 23/42 (54,8%), das crianças estudadas relataram casos de asma na família, demonstrando a hereditariedade da asma, quando se trata do fenótipo alérgico. Por ser uma doença que envolve diferentes genes, os quais sofrem influência dos fatores ambientais, esta hereditariedade não segue padrões clássicos (PINTO et al., 2008).

Dos 42 participantes estudados, 40 descreveram ter rinite (95,2%), 10 (23,81%) tinha diagnóstico de dermatite atópica e 33 (78,6%) teste cutâneo

positivo para ao menos um dos aeroalérgenos testados. Evidências científicas apontam a rinossinusite alérgica como fator agravante no controle da asma e que, crianças com rinite apresentam risco 2,6 vezes maior de ter asma, quando comparado com crianças sem estes sintomas (LASMAR et al., 2012; SOUSA et al., 2012) Estudos recentes descreveram que no Brasil a rinite alérgica está associada a asma em cerca de 72% a 96,5%, (CARVALHO-PINTO et al., 2021).

O tratamento com corticoides inalatórios isolados ou com corticoides sistêmicos foi descrito por 28/42 (66,67%), o uso desta classe de fármacos ocorre por ser escolha para o tratamento da asma, sendo considerado a classe mais eficaz, independente do controle da doença, da gravidade e idade do paciente, visando diminuir os sintomas, cessar as exarcebações e atingir o controle da doença (MOURA et al., 2002; PIZZICHINI et al., 2020; GINA, 2022).

Diferente do que se esperava, foi encontrado espécimes com mais de 2,5% de eosinófilos no escarro entre os pacientes tratados com corticoide inalatório regularmente, o mesmo mostrado por Demarche et al. (2017), que relataram presença de eosinófilos em todos os padrões celulares de escarro de asmáticos tratados com corticoides e Gibson et al. (2003) que relataram que a contagem de eosinófilos no escarro não foi reduzida a valores normais com esse tratamento. Palomino *et al.* 2005 compararam o uso ou não de corticoides em seus grupos de asma leve, moderada e grave para as populações de eosinófilos e neutrófilos, porém não observaram diferença estatística e observaram que em todos os grupos a contagem de eosinófilos no escarro era superior a 2,5% (PALOMINO et al., 2005; TLIBA & PANETTIERI, 2019). Esses achados sinalizam para o fato de que o quantitativo de eosinófilos no escarro em si, não seja o marcador mais adequado para inflamação ativa ou falha de adesão ao tratamento de manutenção.

Por outro lado, observamos que a necessidade de internação hospitalar e a mediana dos eventos de exacerbação foram significativamente inferiores entre os participantes que utilizavam corticoide inalatório regularmente, demonstrando boa resposta e boa adesão ao tratamento independente de pertencerem ao grupo com contagem de eosinófilos > 2,5 % em seus espécimes.

A contagem de eosinófilos em sangue periférico teve mediana de 577,0 variação de 355,0 – 1300,0/ μ L e dosagem de IgE total, de mediana de 810,0

variação de 337,0 – 2707,5 UI/mL, valores superiores aos valores de referência utilizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do CHC-UFPR. A dosagem de IgE sérica e a contagem diferencial e absoluta de eosinófilos no sangue periférico são úteis na identificação de alergias e na caracterização da inflamação envolvida na asma, sendo biomarcadores utilizados para avaliar o risco da asma alérgica em crianças. (REIS & MACHADO, 2018), apontaram que a contagem elevada de eosinófilos em sangue periférico pode ser um indicativo de potencial exacerbação.

Estes achados corroboram com a característica do grupo estudado, composto predominantemente (78%) por crianças atópicas, com presença de eosinófilos no escarro acima de 2,5% em 81% dos participantes e com mediana da contagem de eosinófilos em sangue periférico superior ao valor de referência.

Este estudo mostrou a concordância dos achados de eosinofilia periférica e eosinofilia no escarro. Muitos autores já tentaram demonstrar a correspondência positiva destes achados, mas não há unanimidade na literatura (BENSON et al., 2022).

A contagem de eosinófilos em sangue periférico é de fácil realização, menos laboriosa e onerosa e se, representasse de forma fidedigna a inflamação brônquica, sua determinação poderia fazer parte da rotina dos serviços que atendem asmáticos. Entretanto, a eosinofilia periférica sofre influência de outros fatores, especialmente em crianças, como parasitoses, doenças hematológicas e infecções e poderia ser fator de confusão na interpretação dos resultados (ACHARYA e ACKERMAN 2014).

5.3 CONTROLE DA ASMA

Sessenta por cento (26/42) do grupo apresentava controle da asma no momento da avaliação, e 40% (16/42) que não havia alcançado o controle da asma. Staticescu *et al.* 2014 mostrou uma taxa de asma não controlada em 18% dos pacientes avaliados e 51% dos pacientes estavam com asma parcialmente controlada, porém foram excluídos pacientes que tiveram mais de 2 exacerbações no último ano. Diferente do nosso estudo e isso explica a maior frequência de asma não controlada. A falta de controle da asma está relacionada com necessidade de ajuste da dose, falta de adesão, dificuldade de entendimento da

doença e da necessidade do uso da medicação, dificuldade de acesso ao medicamento, falha na comunicação entre paciente, família e profissionais de saúde e, mais raramente, à resistência a corticoides (BOOSTER et al., 2019). Os dados encontrados, apesar de coincidente com os mostrados na literatura, apontam para a necessidade de maior atenção à educação em asma, que envolve esclarecimentos mais detalhados sobre a doença, treinamento dos dispositivos inalatórios e acompanhamento periódico dos pacientes com doença grave (CHONG NETO et al., 2018; GINA, 2022).

O grupo com asma não controlada, relatou as primeiras crises de asma mais cedo, mediana de 12 meses de idade (5,25 m – 27m), quando comparado ao grupo com asma controlada, com mediana de 24 meses (12 m – 48 m). Uma explicação para o achado possa ser o fato das crianças com início mais precoce da doença, ainda na fase de lactente, possam ter obtido o diagnóstico de asma mais tardiamente, em uma idade em que a sibilância recorrente está comumente envolvida às infecções virais e quadros de comportamento transitório. Este suposto atraso no diagnóstico pode acarretar o encaminhamento tardio ao especialista e conseqüentemente retardar o início da terapêutica anti-inflamatória eficaz para o controle da asma (SALDANHA et al., 2014; CHONG NETO et al., 2018; GINA, 2022).

5.4 PADRÕES CITOLÓGICOS DO ESCARRO

Observou-se, na análise da citologia do escarro induzido, predomínio do padrão eosinofílico (55,0 %), seguido pelo padrão misto (26,0%), paucigranulocítico (14%) e neutrofílico (5,0%). Este comportamento é esperado em crianças asmáticas (PALOMINO et al., 2005; ARAÚJO et al., 2011; GUO et al., 2019) e reafirma o perfil atópico da amostra estudada, já discutido nos achados de altos níveis de IgE total e específica (teste cutâneo alérgico positivo), alta contagem de eosinófilos em sangue periférico e presença maciça de comorbidades alérgicas como a rinite.

Embora haja diferentes valores limites da contagem celular do escarro, para determinar o padrão, em nosso estudo utilizamos os valores descritos por Lex, *et al.* (2005). Sendo assim, para as associações entre os perfis citológicos e

as variáveis pesquisadas, os padrões foram agrupados em grupo eosinofílico, quando a contagem de eosinófilos superava $>2,5\%$ e grupo não eosinofílico, quando a contagem de eosinófilos era $<2,5\%$.

Não foram observadas diferenças no controle da asma nos grupos citológicos avaliados, embora alguns autores que demonstraram que crianças que apresentavam exacerbações graves, tinham predomínio de eosinófilos no escarro e crianças com sintomas leves e moderados apresentavam contagem de eosinófilos baixas, próximas ao valor considerado normal ($>2,5\%$), porém ainda havia eosinófilos no espécime (GUO et al., 2019). Conforme discutido anteriormente, não parece ser o número de eosinófilos o melhor marcador para controle da doença.

5.5 CITOLOGIA DO ESCARRO

Buscando entender a correlação da celularidade com o controle da asma, analisamos cada célula individualmente. Apesar da contagem de eosinófilos no grupo de asma não controlada mostrar uma mediana maior, este achado não foi significativo ($p=0,233$), diferente do que foi observado quanto a presença de granulações eosinofílica onde a intensidade foi significativamente maior no grupo com asma não controlada (GRÁFICO 2, $p=0,042$).

Grânulos eosinofílicos livres correspondem à eosinófilos em atividade (KJARSGAARD et al., 2021). A liberação de grânulos eosinofílicos ricos em proteínas catiônicas, como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), eosinófilo peroxidase (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), contribuem para a lesão do epitélio brônquico, desenvolvimento da resposta imunológica tipo Th2, cascata de citocinas, ativação de IgE e agravamento da doença (BAKAKOS et al., 2019; KJARSGAARD et al., 2021).

Diante deste achado, este estudo sugere que, a presença de grânulos eosinofílicos, indicando atividade dos eosinófilos, seja um biomarcador mais adequado de inflamação ativa e justificaria o fato de sua frequência ser significativamente maior no grupo de asma não controlada.

Estudos recentes já sugerem que a medição de proteínas de grânulos de eosinófilos, citocinas eosinofílicas em sobrenadante do escarro induzido, como a

proteína catiônica eosinofílica, e ainda, proteínas quimiotáticas eosinofílicas, como a eotaxina, sejam marcadores mais eficazes para verificar o grau de inflamação das vias aéreas na asma (AN et al., 2020; KJARSGAARD *et al.*, 2021).

Ainda na análise individual das células encontradas no escarro, os macrófagos ganharam destaque por estarem significativamente mais presentes no grupo de asma controlada.

Resultado semelhantes já foram descritos por com vários autores que estudaram a citologia de escarro de adultos e crianças com asma (Chen et al., 2013; VERAS et al., 2011).

Palomino *et al.* (2005) encontraram média de $48,8 \pm 20,9$ macrófagos no grupo de crianças com asma leve e média de $13,6 \pm 9,3$ no grupo de exacerbação ($p < 0,005$). Stănescu *et al.* (2014) avaliaram crianças com asma com diferentes graus de controle e obtiveram média de macrófagos de 11,2% ($\pm 13,6$), nas asma controladas, significativamente maior quando comparados aos casos com parcial controle ou sem controle.

Em nosso estudo a mediana de macrófagos entre as crianças com asma controlada foi significativamente maior que a mediana das crianças com asma não controlada, 42,0% (20,25-63,75) e 11,5% (5,75-37,25) respectivamente.

Os macrófagos são células que se originam a partir de monócitos que migram da circulação sanguínea para os tecidos e estão associados a processos infecciosos e inflamatórios como a asma (BAIN, 2016). Estas células constituem cerca de 7% das células dos pulmões e se dividem em macrófagos intersticiais e macrófagos alveolares (SHARMA, 2017) atuando na imunidade inata e desempenhando importante papel na renovação e regeneração tecidual (KULKARNI, 2018). Os macrófagos alveolares são encontrados na luz dos alvéolos e, independente da sua origem, são responsáveis pelo mecanismo de defesa inato inespecífico (BALHARA, 2012; FRICKER, 2017) e desempenham papel de ativação e supressão da inflamação (KULKARNI, 2018). Em indivíduos com asma os macrófagos alveolares são classificados em M1 e M2 dependendo da sua função, e estão associados a indução e progressão da inflamação eosinofílica, entretanto, impedem o desenvolvimento da inflamação neutrofílica (DRAIJER et al., 2018).

Macrófagos M1, classicamente ativados estão relacionados a resposta imunológica inata e aos linfócitos Th1, fator de necrose tumoral (TNF) $-\alpha$ e interferon (IFN) $-\gamma$, liberam interleucinas e quimiocinas inflamatórias, são responsáveis pela imunidade contra patógenos intracelulares e tumores. Os macrófagos M2, ativados alternativamente, são responsáveis pela destruição de parasitas, possuem atividade fagocítica, facilitam a resposta imune Th2 e a secreção de citocinas (IL-4 e IL-13) que regulam o processo inflamatório e estimulam o processo de reparo tecidual das vias aéreas (MONIUSZKO et al., 2007; YANG et al., 2012; FRICKER 2017; DRAIJER et al., 2018; KULKARNI et al., 2018)

A capacidade fagocítica de micro-organismos, partículas estranhas, bactérias e leveduras, realizado pelos macrófagos alveolares, ocorre de modo deficiente em indivíduos asmáticos prejudicada pelo efeito tóxico das proteínas eosinofílicas presente em pacientes com asma eosinofílica (VAN DER VEEN et al., 2020). Na amostra estudada, de fato, a ausência de grânulos eosinofílicos (18 casos) foi mais frequente do que a presença de grânulos (4 casos) no grupo com macrófagos acima da média, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa ($p=0.2157$).

Sabe-se que a composição do escarro de pessoas sem doença respiratória mostrou predomínio de macrófagos sobre as demais células pesquisadas, como descrito por Veras *et al.* 2011, onde a média de macrófagos encontrada foi de $68,4\% \pm 14,7$ em população adultos saudáveis e Chen *et al.* 2013, quando analisou o escarro de crianças e adolescentes sem relatos de doenças respiratórias, encontrou média de $65,31\% \pm 1,96$. Estes estudos sinalizam que, na ausência de inflamação, em indivíduos saudáveis, os macrófagos alveolares predominam na composição da citologia do escarro, sendo um marcador que indicaria saúde respiratória.

Estes achados corroboram com o presente estudo, onde as 26 crianças com asma controlada, apresentaram significativamente ($p=0,027$) maior número de macrófagos quando comparadas com o grupo sem controle da asma. Estes achados indicam que no momento da coleta do escarro, apresentavam-se com controle considerável da inflamação brônquica, apontando uma eficiente ação da anti-inflamatória dos macrófagos.

6. CONCLUSÕES

- 6.1 A indução de escarro em pré-escolares e escolares com asma é um método executável, pouco invasivo e seguro, podendo ser incorporado na rotina dos serviços de referência especializados no atendimento da asma. As amostras adequadas para a análise corresponderam à 70% da amostra inicial.
- 6.2 O padrão eosinofílico predominou no grupo estudado, correspondendo 51% da amostra quando avaliado isoladamente e quando agrupado ao padrão misto, representou 81% das amostras avaliadas.
- 6.3 Houve associação significativa entre os padrões de escarro estudados e as variáveis clínicas e laboratoriais avaliadas. Verificou-se maior frequência de conjuntivite nos pacientes com padrão não-eosinofílico do escarro.
- 6.4 Houve predomínio de macrófagos no grupo de asma controlada e predomínio de grânulos eosinofílicos no grupo de asmáticos não controlados, quando se avaliou isoladamente cada célula encontrada no escarro. Quanto aos padrões determinados de escarro não foi observado diferença entre o grupo de asma controlada e não controlada.
- 6.5 Não houve relação entre a citologia do escarro e o uso de corticoide inalatório, entretanto houve significado estatístico entre o uso de corticoide inalatório e a necessidade de intervenções hospitalares.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A indução do escarro é uma técnica viável para crianças. Em nosso estudo planejávamos padronizar a técnica para crianças de três a seis anos, uma vez que esta técnica já está padronizada e validada para maiores de seis anos. Porém com o início da pandemia do novo coronavírus, em março de 2020, o recrutamento de participantes foi interrompido e impossibilitou o recrutamento de um número maior de crianças, especialmente de pré-escolares conforme programado.

Mesmo com este agravo, duas crianças com cinco anos de idade tiveram sucesso na coleta de amostra e sem intercorrências. A pandemia também comprometeu a coleta de amostra de sangue para hemograma e dosagem de IgE, que foram suspensos em 2020 e 2021, reduzindo consideravelmente o tamanho da amostra.

Entretanto, apesar das limitações, algumas associações contribuíram para o entendimento da inflamação e do controle da asma na infância.

7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho mostrou ser possível a indução e avaliação do escarro induzido em crianças, podendo, em estudos futuros recrutar crianças menores de seis anos para padronizar e validar a técnica para esta faixa etária.

Buscar, não somente a contagem diferencial da citologia do escarro, mas medir as interleucinas envolvidas, como as secretadas pelos eosinófilos ativados (proteína catiônica eosinofílica, peroxidase eosinofílica), bem como, as demais interleucinas que configuram inflamação tipo2, IL4, IL5, IL-10, IL13, possíveis de serem avaliadas no sobrenadante das amostras de escarro.

Nossa ideia é continuar avaliando as crianças asmáticas, para elucidar a inflamação brônquica, especialmente nos pré-escolares asmáticos.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil granule proteins: Form and function. **Journal of Biological Chemistry**, 20. jun. 2014. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.
- AN, J.; LEE, J. H.; SIM, J. H.; et al. Serum Eosinophil-Derived Neurotoxin Better Reflect Asthma Control Status Than Blood Eosinophil Counts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 8, n. 8, p. 2681- 2688.e1, 2020. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology.
- ARAGÃO, L. J. L.; CORIOLANO-MARINUS, W. , M. L.; SETTE, G. C. S.; et al. **Qualidade de vida na asma brônquica-a concordância das percepções das crianças, adolescentes e seus pais Quality of life in asthmatics-concordance among children, adolescents, and their parents**. 2012.
- ARAÚJO, L.; MOREIRA, A.; PALMARES, C.; et al. **Induced Sputum in Children Induced Sputum in Children: Success Determinants, Safety, and Cell Profiles**. 2011.
- BAKAKOS, A.; LOUKIDES, S.; BAKAKOS, P. Severe eosinophilic asthma. **Journal of Clinical Medicine**, 1. set. 2019. MDPI.
- BALHARA, J.; GOUNNI, A. S. The alveolar macrophages in asthma: A double-edged sword. **Mucosal Immunology**, nov. 2012.
- BENSON, V. S.; HARTL, S.; BARNES, N.; et al. Blood eosinophil counts in the general population and airways disease: A comprehensive review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, 1. jan. 2022. European Respiratory Society.
- BOECHAT J. L.; RIOS J. L.; SANT'ANNA C. C.; FRANÇA A. T. **Prevalência e gravidade de sintomas relacionados à asma em escolares e adolescentes no município de Duque deCaxias, Rio de Janeiro**. *J Bras Pneumol* 2005; 31(2): 111-7., 2005.
- BOONPIYATHAD, T.; SÖZENER, Z. C.; SATITSUKSANOVA, P.; AKDIS, C. A. Immunologic mechanisms in asthma. **Seminars in Immunology**, 1. dez. 2019. Academic Press.

BOOSTER, G. D.; OLAND, A. A.; BENDER, B. G. Treatment Adherence in Young Children with Asthma. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, 1. maio 2019. W.B. Saunders.

CARDOSO, T. A.; RONCADA, C.; SILVA, E. R.; et al. The impact of asthma in Brazil: A longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 163–168, 2017. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

CARVALHO-PINTO, R. M.; CANÇADO, J. E. D.; PIZZICHINI, M. M. M.; et al. 2021 Brazilian Thoracic Association recommendations for the management of severe asthma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 47, n. 6, 2021. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

CHEN, D. H.; ZHONG, G. Y.; LUO, W.; et al. Reference values of induced sputum cytology in healthy children in Guangzhou, Southern China. **Pediatrics**, v. 131, n. 2, 2013.

CHONG NETO, H. J.; SOLÉ, D.; CAMARGOS, P.; et al. Diretrizes da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e Sociedade Brasileira de Pediatria para sibilância e asma no pré-escolar. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 2, n. 2, 2018. GN1 Genesis Network.

CHONG-NETO, H. J.; WANDALSEN, G. F.; PASTORINO, A. C.; et al. Practical guide to approaching children and adolescents with severe asthma: a joint document of the Brazilian Association of Allergy and Immunology and the Brazilian Society of Pediatrics. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 4, n. 1, 2020. GN1 Genesis Network.

DEMARCHE, S. F.; SCHLEICH, F. N.; PAULUS, V. A.; et al. Asthma Control and Sputum Eosinophils: A Longitudinal Study in Daily Practice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 5, n. 5, p. 1335- 1343.e5, 2017. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology.

DORTAS JUNIOR, S. D.; LEVY, S. A. P.; PIRES, A. H. S.; et al. **Teste de contato atópico com aeroalérgenos: uma ferramenta promissora no diagnóstico da dermatite atópica Artigo Original Atopy patch test with aeroallergens: a promising tool in the diagnosis of atopic dermatitis.** 2013.

DRAIJER, C.; ROBBE, P.; BOORSMA, C. E.; HYLKEMA, M. N.; MELGERT, B. N. dual role of YM1+M2 macrophages in allergic lung inflammation. **scientific reports**, v. 8, n. 5105, p. 1–12, 2018.

DREWS, A. C.; ESCOUTO, D. C.; STEIN, R. T. **Uso do escarro induzido na avaliação da inflamação de vias aéreas em pacientes com asma**. Porto Alegre, 2006.

FERREIRA, W. F. S.; CHONG-SILVA, D. C.; MURATA, J. M. K.; et al. Fatores associados ao sexo para sibilância recorrente e asma. **Arquivos de Asmas Alergia e Imunologia**, v. 4, n. 2, 2020. GN1 Genesis Network.

FLEMING, L.; WILSON, N.; REGAMEY, N.; BUSH, A. Use of sputum eosinophil counts to guide management in children with severe asthma. **Thorax**, v. 67, n. 3, p. 193–198, 2012. BMJ Publishing Group.

FONTES, M. J. F.; FONSECA, M. T. M.; CAMARGOS, P. A. M.; AFFONSO, A. G. A.; CALAZANS, G. M. C. **Asma em menores de cinco anos: dificuldades nodiagnóstico e na prescrição da corticoterapia inalatória**. BELO HORIZONTE, 2005.

FRICKER, M.; GIBSON, P. G. Macrophage dysfunction in the pathogenesis and treatment of asthma. **European Respiratory Journal**, v. 50, n. 3, 2017. European Respiratory Society.

GIAVINA-BIANCHI, P. Resposta imune tipo 2. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 3, 2017. GN1 Genesis Network.

GIBSON, P. G.; SIMPSON, J. L.; HANKIN, R.; POWELL, H.; HENRY, R. L. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. **Thorax**, v. 58, n. 2, p. 116–121, 2003.

GINA 2022: Global Initiative for Asthm. **.www.ginasthma.org**, 2022.

Global Asthma Network The Global Asthma Report. 3º ed. New Zealand, 2018.

GONÇALVES, J.; PIZZICHINI, E.; PIZZICHINI, M. M. M.; et al. Confiabilidade da coloração hematológica rápida para citologia de escarro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, n. 3, p. 250–258, 2014. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

GUO, Y.; ZOU, Y.; ZHAI, J.; et al. Phenotypes of the inflammatory cells in the induced sputum from young children or infants with recurrent wheezing. **Pediatric Research**, v. 85, n. 4, p. 489–493, 2019. Nature Publishing Group.

- KJARSGAARD, M.; ADATIA, A.; BHALLA, A.; et al. Underestimation of airway luminal eosinophilia by quantitative sputum cytometry. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 17, n. 1, 2021. BioMed Central Ltd.
- KOLOSKOVA, O. K.; TARNAVSKA, S. I.; LOBANOVA, T. O. **Peculiarities of inflammatory response in schoolchildren suffering from bronchial asthma**. 2017.
- KULKARNI, N.; KANTAR, A.; COSTELLA, S.; et al. Macrophage phagocytosis and allergen avoidance in children with asthma. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, 2018. Frontiers Media S.A.
- KUSCHNIR, F. C.; GURGEL, R. Q.; SOLÉ, D.; et al. ERICA: Prevalence of asthma in Brazilian adolescents. **Revista de Saude Publica**, v. 50, p. 1s–10s, 2016. UNIV SAOPAULO.
- LASMAR, L. M. L. B. F.; FERNANDES, R. V.; HARTMANN, I.; et al. Asma de difícil controle em pediatria: desafio presente e futuro. **Rev Med Minas Gerais**, v. 22, n. 2, p. 181–187, 2012.
- LEITE, M.; PONTE, E. V.; PETRONI, J.; et al. **Avaliação do Questionário de Controle da Asma validado para uso no Brasil* Evaluation of the Asthma Control Questionnaire validated for use in Brazil**. 2008.
- LEX, C.; PAYNE, D. N.R.; ZACHARASIEWICZ, A.; et al. Sputum induction in children with difficult asthma: Safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. **Pediatric Pulmonology**, v. 39, n. 4, p. 318–324, 2005.
- LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012. Elsevier B.V.
- MAHMUDI-AZER, S.; ODEMUYIWA, S. O.; MOQBEL, R. Intelligent granules: Are eosinophil crystalloid granules inimitable? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, jul. 2010.
- MARQUES, C. P. C.; BLOISE, R. F.; LOPES, L. B. M.; et al. Epidemiologia da Asma no Brasil, no período de 2016 a 2020. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e5211828825, 2022. Research, Society and Development.

- MCGEACHIE, M. J.; YATES, K. P.; ZHOU, X.; et al. Patterns of Growth and Decline in Lung Function in Persistent Childhood Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 19, p. 1842–1852, 2016. Massachusetts Medical Society.
- MELO, R. C. N.; LIU, L.; XENAKIS, J. J.; SPENCER, L. A. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: Unraveling novel mechanisms of selective secretion. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2013.
- MOELLER, A.; CARLSEN, K. H.; SLY, P. D.; et al. Monitoring asthma in childhood: Lung function, bronchial responsiveness and inflammation. **European Respiratory Review**, v. 24, n. 136, p. 204–215, 2015. European Respiratory Society.
- MONIUSZKO, M.; BODZENTA-LUKASZYK, A.; KOWAL, K.; DBROWSKA, M. Bronchial macrophages in asthmatics reveal decreased CD16 expression and substantial levels of receptors for IL-10, but not IL-4 and IL-7. **FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA**, v. 45, n. 3, p. 181–189, 2007.
- MORITZ, P.; JOHN, L.; STEIDLE, M.; et al. **Determinação do componente inflamatório das doenças das vias aéreas através do escarro induzido: utilização na prática clínica*** **Determination of the inflammatory component of airway diseases by induced sputum cell counts: use in clinical practice.** 2008.
- MOURA, J. A. R.; CAMARGOS, P. A. M.; BLIC, J. **Tratamento profilático da asma Prophylactic treatment of asthma.** 2002.
- NATALI, R. M. T.; SANTOS, D. S. P. S.; FONSECA, A. M. C.; et al. **Perfil de internações hospitalares por doenças respiratórias em crianças e adolescentes da cidade de São Paulo, 2000-2004 Hospital admissions due to respiratory diseases in children and adolescents of São Paulo city, 2000-2004.** 2011.
- OLIVEIRA, S. G.; SARRIA, E. E.; RONCADA, C.; et al. Validation of the Brazilian version of the childhood asthma control test (c-ACT). **Pediatric Pulmonology**, v. 51, n. 4, p. 358–363, 2016. John Wiley and Sons Inc.
- PALOMINO, L. M.; BUSSAMRA, M. H. C. F.; SARAIVA-ROMANHOLO, B. M.; et al. Escarro induzido em crianças e adolescentes com asma: segurança,

aplicabilidade clínica e perfil de células inflamatórias em pacientes estáveis e durante exacerbação. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 3, p. 216–224, 2005.

PELAIA, C.; CRIMI, C.; VATRELLA, A.; et al. Molecular Targets for Biological Therapies of Severe Asthma. **Frontiers in Immunology**, 30. nov. 2020. Frontiers Media S.A.

PINTO, L. A.; STEIN, R. T.; KABESCH, M. Impact of genetics in childhood asthma. **Jornal de Pediatria**, jul. 2008.

PIZZICHINI, E.; PIZZICHINI, M. M. M.; EFTHIMIADIS, A.; et al. **Indices of Airway Inflammation in Induced Sputum: Reproducibility and Validity of Cell and Fluid-Phase Measurements**. 1996.

PIZZICHINI, M. M. M.; CARVALHO-PINTO, R. M.; CANÇADO, J. E. D.; et al. 2020 Brazilian thoracic association recommendations for the management of asthma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, n. 1, p. 1–16, 2020. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

PREZOTTO, K. H.; LENTSCK, M. H.; AIDAR, T.; FERTONANI, H. P.; MATHIAS, T. A. F. Hospitalizations of children for preventable conditions in the state of Parana: causes and trends Hospitalizações de crianças por condições evitáveis no Estado do Paraná: causas e tendência. **Acta Paul Enferm**, v. 30, n. 3, p. 254–61, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1982->>. .

REDDEL, H. K.; BACHARIER, L. B.; BATEMAN, E. D.; et al. Global Initiative for Asthma Strategy 2021: executive summary and rationale for key changes. **European Respiratory Journal**, v. 59, n. 1, 2022. European Respiratory Society.

REIS, A. P.; MACHADO, J. A. N. Medicina de precisão na asma. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 4, 2017. GN1 Genesis Network.

REIS, A. P.; MACHADO, J. A. N. Biomarcadores e imunobiológicos na asma. **Brazilian Journal of Allergy and Immunology (BJAI)**, v. 2, n. 4, 2018. GN1 Genesis Network.

RODRIGUES, A. S.; SOBRINHO, L. A.; FERREIRA, B. D.; et al. Abordagem geral da asma: uma revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, v. 1, n. 2, p. e9129, 2021. Revista Eletronica Acervo Saude.

ROXO, J. P. F.; PONTE, E. V.; RAMOS, D. C. B.; et al. **Portuguese-language version of the Asthma Control Test: validation for use in Brazil* Validação do Teste de Controle da Asma em português para uso no Brasil**. 2010.

SALDANHA, C. T.; LIMA, E.; SALDANHA, R. P.; et al. **Asma: Idade de Surgimento Pode ser um Fator para o Aumento da Prevalência Asthma: Age of Onset May be a Factor for the Increased Prevalence**. 2014.

SANTOS, G. M.; PRATES, S.; LEIRIA-PINTO, P. Eosinophils and il-5 – new horizons for the treatment of asthma and other eosinophilic diseases. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 28, n. 4, p. 207–216, 2020. Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica.

LA SCALA CINTIA S. KUROKAWA. Qualidade de vida em asmáticos: avaliação de instrumento para uso em crianças e adolescentes. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 28, n. 1, p. 32–38, 2005.

SCHOETTLER, N.; STREK, M E. Recent Advances in Severe Asthma: From Phenotypes to Personalized Medicine. **Chest**, 1. mar. 2020. Elsevier Inc.

SHARMA, N.; AKKOYUNLU, M.; RABIN, R. L. Macrophages—common culprit in obesity and asthma. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 1. jun. 2018. Blackwell Publishing Ltd.

SIILVA, E. C. F.; DIAS, G. A. C. **Imunopatogenia da asma**. RIO DE JANEIRO, 2013.

SIMPSON, J. L.; BAFADHEL, M. Alternatives to induced sputum for identifying inflammatory subtypes of asthma. **Respirology**, 1. maio 2017. Blackwell Publishing.

SOUSA, C. A.; CÉSAR, C. L. G.; BARROS, M. B. A.; et al. **Doenças respiratórias e fatores associados: estudo de base populacional em São Paulo, 2008-2009**. 2012.

TLIBA, O.; PANETTIERI, R. A. Paucigranulocytic asthma: Uncoupling of airway obstruction from inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 4, p. 1287–1294, 2019. Mosby Inc.

VAN DER VEEN, T. A.; DE GROOT, L. E. S.; MELGERT, B. N. The different faces of the macrophage in asthma. **Current opinion in pulmonary medicine**, 1. jan. 2020. NLM (Medline).

VERAS, T. N.; PIZZICHINI, E.; STEIDLE, L. J. M.; et al. **Composição celular do escarro induzido em adultos saudáveis* Cellular composition of induced sputum in healthy adults Artigo Original**. 2011.

VIANNA, E. O. O escarro induzido na prática médica. **J BRAS PNEUMOL**, v. 34, n. 11, p. 889–890, 2008.

WANG, H.; NAGHAVI, M.; ALLEN, C.; et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616310121>>. .

YANG, M.; KUMAR, R. K.; HANSBRO, P. M.; FOSTER, P. S. Emerging roles of pulmonary macrophages in driving the development of severe asthma. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 4, p. 557–569, 2012a. Wiley.

YANG, M.; KUMAR, R. K.; HANSBRO, P. M.; FOSTER, P. S. Emerging roles of pulmonary macrophages in driving the development of severe asthma. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 4, p. 557–569, 2012b. Wiley.

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Nós, Prof. Dra. Débora Carla Chong e Silva, Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, Prof. Dr. Sérgio Luiz Bach e Denise Eli, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando, pais e/ou responsáveis de pelas crianças e adolescentes de 3 a 14 anos com diagnóstico de asma e demais sintomas respiratórios, a participar de um estudo intitulado **Comparação do perfil celular do escarro induzido em crianças com asma controlada e não controlada atendidas no serviço de pneumologia e alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**. Ou seja, será realizado a análise celular com microscopia de todas as amostras e estes resultados comparados com os dados do controle da asma. A identificação do perfil celular da citologia de escarro induzido nos grupos avaliados pode demonstrar o comportamento da asma nesses pacientes facilitando a conduta terapêutica e medidas profiláticas às crises, reduzindo episódios de exacerbação, principalmente no grupo com asma não controlada.

O objetivo desta pesquisa é identificar o perfil celular da citologia de escarro em pacientes com asma controlada e não controlada, e associar os resultados com o controle da asma e a qualidade de vida dos pacientes.

Para a realização deste estudo seu (a) filho (a) será atendido no Ambulatório de Alergias e Pneumologia Respiratória do Hospital de Clínicas da UFPR, rua Padre Camargo n 453, Alto da Glória – Curitiba/PR. E será submetido (a) a avaliação do peso, altura, histórico clínico, gravidade e controle da asma, funcionalidade pulmonar (respiração), citologia do escarro (células do catarro) por meio, dos seguintes procedimentos:

a) Peso e altura: O peso será obtido, utilizando-se balança da marca Welmy com seu (a) filho (a) descalço (a) e posicionado (a) no centro da balança.

A altura será medida (em centímetros) por um estadiômetro (régua) da mesma marca da balança, com seu (a) filho (a) ainda descalço, em pé com o peso do corpo distribuído em ambas as pernas e braços ao longo do corpo, pés unidos, joelhos estendidos.

b) Histórico clínico: serão coletados dados como tempo de diagnóstico, medicações em uso, doenças associadas e exames radiológicos. Para a obtenção destes dados será consultado o prontuário do seu (a) filho (a).

c) Gravidade da asma: será avaliada, por meio, da análise dos medicamentos necessários para controlar os sintomas e crises da doença;

d) Controle da Asma: será avaliado, por meio, de um questionário que possui cinco itens que dizem respeito aos sintomas, uso de medicação de alívio e efeito da asma nas atividades diárias presentes nas últimas quatro semanas. **Este questionário será respondido** pelo seu (a) filho (a) caso o mesmo (a) apresente idade igual ou superior a 12 anos ou **pelo (a) senhor (a) caso seu (a) filho (a) tenha idade inferior a 12 anos;**

e) A avaliação da funcionalidade pulmonar será realizada por meio da espirometria. Seu (a) filho (a) será posicionado (a) sentado (a), com os pés apoiados, de frente para o equipamento, será colocado um clipe nasal em seu nariz e solicitado que acople a peça bucal do espirômetro em sua boca sobre a língua, entre os dentes, cerre os lábios e segure com as mãos as bochechas, para que desta forma evite-se vazamentos. Ao sinal do avaliador, deverá puxar o ar profundamente até o máximo possível, prender o ar por um a dois segundos e depois exalar rapidamente com o máximo esforço até que o avaliador solicite a interrupção. A manobra será repetida três vezes seguidas sendo utilizado o valor mais alto obtido. Se a diferença entre as três medidas for maior que 5%, o teste será repetido. Ao final da espirometria serão administrados 400 µg de salbutamol aerossol com auxílio de espaçador e máscara esterilizados com hipoclorito, e após 15 minutos será repetida a espirometria;

f) Citologia do escarro: seu (a) filho (a) será sentado (a) em uma cadeira e realizada inalação com concentrações de soro de forma seriada (3%, 5% e 7%) utilizando-se aparelho de inalação tecnologia *Mesh*, Nebzmart, marca Glenmark, 2018, por sete minutos cada, totalizando 21 minutos de inalação. Ao final de cada nebulização, seu (a) filho (a) será orientado (a) a enxaguar a boca, engolir água,

assoar o nariz e instruído (a) a tossir e a depositar o escarro em recipiente limpo e estéril.

Rubricas: Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Alguns riscos podem relacionados ao estudo podem ser: tosse, broncoespasmo, sensação de falta de ar e sensação de gosto amargo na boca, os quais, poderão ser solucionados, por meio, da interrupção do exame e o uso de broncodilatores inalatórios. Riscos como constrangimento e com pesquisa retrospectiva com prontuários, a perda de documentos, quebra da confidencialidade serão minimizadas ao utilizar linguagem simples e armazenar os dados com o pesquisador responsável.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: a melhora na conduta terapêutica de profilaxia e mesmo o tratamento direcionado auxilia na qualidade de vida destes pacientes.

Os pesquisadores Débora Chong, Nelson Augusto Rosário Filho, Denise Eli e Sérgio Luiz Bach responsáveis por este estudo, poderão ser localizados para esclarecer eventuais dúvidas que (o Senhor, a Senhora) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo a por e-mail, telefone em horário comercial (caracterizar qual pó horário comercial mencionado). Em situações de emergência ou urgência, relacionadas à pesquisa, os mesmos poderão ser contatados pelo **telefone Débora Chong (41) 98402-3974, Nelson Augusto Rosário Filho (41) 991015181, Denise Eli (41)996574526 e Sérgio Luiz Bach (41)992160132.**

Se (o Senhor, a Senhora) tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP é de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

A participação de seu filho (a) neste estudo é voluntária e se (o Senhor, a Senhora) não quiser mais que ele (a) faça parte da pesquisa, poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento

Livre e Esclarecido assinado. O atendimento de seu filho (a) está garantido e não será interrompido caso o (o Senhor, a Senhora) desista de participar.

Rubricas: Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas (mencionar quem são: orientador, médico, autoridade sanitária, etc..., quando for o caso). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**

O material obtido, amostras biológicas e questionários, serão utilizados unicamente para esta pesquisa e serão destruídos ou descartados. As amostras serão descartadas em compartimento apropriado existente no laboratório, logo após as análises e os questionários destruídos ao término do estudo, dentro de 2 anos.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa, os custos da pesquisa, como papel, impressora, estatístico, bem como materiais de laboratório, não são de sua responsabilidade e (o Senhor, a Senhora) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Seu filho terá a garantia de que problemas como: (tosse, broncoespasmo, sensação de falta de ar e sensação de gosto amargo na boca, decorrentes do estudo, serão tratados no próprio Ambulatório de Alergias e Pneumologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim nem para meu tratamento ou atendimento ordinários que eu possa receber de forma rotineira na Instituição. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema diretamente relacionado ao desenvolvimento da pesquisa.

Rubricas: Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome por extenso, legível do Participante e/ou Responsável Legal

Assinatura do Participante e/ou Responsável Legal

















Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou seu representante legal para a participação neste estudo.

Nome extenso do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Curitiba,

APÊNDICE 2 – ACT (ASTHMA CONTROL TEST)

QUESTÃO	PONTUAÇÃO
<p>1 - Como está sua asma hoje?</p>     <p>(0) Muito ruim (1) Ruim (2) Boa (3) Muito boa</p>	
<p>2 - Quanto problema sua asma causa quando você corre, se exercita ou pratica algum esporte?</p>     <p>(0) Muito problema. Não posso fazer o que quero (1) É um problema e eu não gosto (2) Algum problema, mas tudo bem (3) Nenhum problema</p>	
<p>3 - Você tosse devido a sua asma?</p>     <p>(0) Sim, o tempo todo (1) Sim, a maior parte do tempo (2) Sim, às vezes (3) Não, em nenhum momento</p>	
<p>4 - Você acorda no meio da noite devido a sua asma?</p>     <p>(0) Sim, o tempo todo (1) Sim, a maior parte do tempo (2) Sim, às vezes (3) Não, em nenhum momento</p>	
<p>5 - Nas últimas 4 semanas, quantos dias/mês seu filho teve algum sintoma da asma durante o dia?</p> <p>(5) Nenhum (4) 1 a 3 dias/mês (3) 4 a 10 dias/mês (2) 11 a 18 dias/mês (1) 19 a 24 dias/mês (0) Todos os dias</p>	
<p>6 - Nas últimas 4 semanas, quantos dias/mês seu filho teve algum chiado durante o dia?</p> <p>(5) Nenhum (4) 1 a 3 dias/mês (3) 4 a 10 dias/mês (2) 11 a 18 dias/mês (1) 19 a 24 dias/mês (0) Todos os dias</p>	
<p>7 - Nas últimas 4 semanas, quantos dias/mês seu filho acordou no meio da noite devido à asma?</p> <p>(5) Nenhum (4) 1 a 3 dias/mês (3) 4 a 10 dias/mês (2) 11 a 18 dias/mês (1) 19 a 24 dias/mês (0) Todos os dias</p>	
<p>SCORE FINAL (soma dos 7 itens acima)</p>	
<p>IMPORTANTE: A criança deverá responder às questões de 1 a 4. Os pais podem ajudar na leitura das mesmas, mas a criança deverá escolher a opção. Os pais devem responder às questões 5 a 7 sem se deixar influenciar pelas respostas iniciais da criança. O escore do questionário é calculado a partir da soma dos valores de cada questão. As respostas que indicam maior controle da asma devem receber maior pontuação. Dessa forma, o escore do questionário varia entre 0 e 27 pontos: quanto maior o escore, mais controlada é a asma. Escore \geq 19 pontos: asma controlada.</p>	

* Oliveira SG, Sarria EE, Roncada C, Stein RT, Pitrez PM, Mattiello R. Validation of the Brazilian version of the childhood asthma control test (c-ACT). *Pediatr Pulmonol.* 2016;51(4):358-63.

Figura 1 - Teste de Controle da Asma (ACT) para faixa etária de 4 a 11 anos validado para o português*

ANEXO 1 – PARECER SUBSTANCIADO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação do perfil Celular do escarro induzido em crianças com asma controlada e não controlada atendidas no Serviço de Pneumologia e Imunologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Pesquisador: Debora Carla Chong e Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 19808419.9.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.648.296

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

Trata-se de estudo observacional, analítico, caso controle com coleta prospectiva de dados e de amostra de escarro induzido de crianças atendidas no Ambulatório de Alergia e Pneumologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná com idade entre 3 anos e 14 anos; serão incluídos na pesquisa pacientes que tem diagnóstico de asma.

A asma acomete um grande grupo da população mundial. Caracterizada por crises de obstrução ao fluxo aéreo em graus variáveis, necessitando de atendimento emergencial até internação para controle do quadro. O diagnóstico é realizado por sintomas clínicos e espirometria, associado ou não ao teste cutâneo alérgico, entretanto nos últimos anos a citologia do escarro induzido tem auxiliado no conhecimento da celularidade do escarro e

avaliação do padrão inflamatório da asma. Este resultado auxilia no direcionamento da conduta terapêutica, com a finalidade de reduzir os episódios de exacerbação. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é avaliar o perfil celular do escarro induzido de 150 pacientes asmáticos com a doença controlada e não controlada atendidos pelo Ambulatório de Alergia e Pneumologia do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade

Federal do Paraná no período de agosto de 2019 a agosto de 2020. Na pesquisa, serão incluídos

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.648.296

pacientes pediátricos de ambos os sexos com idade entre 3 e 14 anos, serão avaliados a citologia de escarro juntamente com dados clínicos, avaliação do controle da asma e avaliação da qualidade de vida informado pelos responsáveis no momento da coleta.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar se o perfil de celularidade do escarro induzido de crianças e adolescentes esta associado com o controle e gravidade da asma.

Objetivo Secundário:

- Identificar o predomínio celular da asma controlada e asma não controlada.
- Verificar se a presença de inclusões escuras nos macrófagos (sugestivo de contato com fumaça de cigarro / poluição) está associada ao controle da asma.
- Associar o perfil citológico encontrado com o grau de controle da asma e com nível de qualidade de vida dos pacientes;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco de participação no estudo consistirá na possibilidade de apresentar tosse por alguns instantes após a coleta, gosto de sal na boca, e/ou enjôo durante a coleta. O participante será informado que a qualquer momento poderá desistir da participação no estudo e retirar seu termo de consentimento.

Benefícios:

A contribuição deste estudo para a comunidade médica e para a sociedade se faz pela suposição de que com a identificação do perfil celular do escarro induzido dos grupos avaliados e atendidos pelo CHC-UFPR, o clínico terá um auxílio objetivo para a escolha de tratamento e ajuste de dose da corticoterapia administradas a estes pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pós graduação de grande importância para as crianças asmáticas.

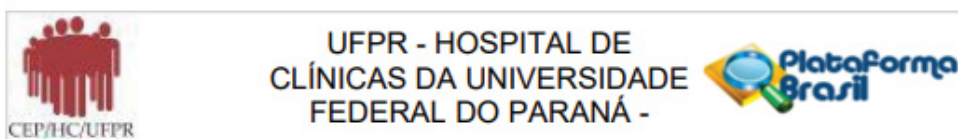
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cartas apresentadas e TCLE e TALE adequados

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica, o mesmo deve estar em formatação adequada e com as caixas

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.648.296

Infraestrutura	CONCORDANCIA_ULAC.pdf	09/06/2019 17:59:15	Denise Eli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ENCAMINHAMENTO_CEP.pdf	09/06/2019 17:58:52	Denise Eli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DENISE_ELI.docx	09/06/2019 17:29:37	Denise Eli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ADULTO.docx	09/06/2019 17:25:54	Denise Eli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_ASSENTIMENTO_ADOSLECE NTE.docx	09/06/2019 17:25:33	Denise Eli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 17 de Outubro de 2019

Assinado por:
maria cristina sartor
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

ANEXO 2 – RESUMO PUBLICADO: CONGRESSO ASBAI, 2019.

**Endótipo da asma grave na criança:
estamos sempre diante da asma eosinofílica?**

Elessandra Souza Bitencourt, Denise Eli, Danieli Ribas, Roberta Cunha,
Herberto José Chong Neto, Carlos Antonio Riedi, Cristine Secco Rosario,
Débora Carla Chong e Silva, Nelson Augusto Rosário Filho

Racional: O manejo da asma grave é um desafio na pediatria. O padrão de inflamação tem relação com a gravidade e o controle da asma mas foi pouco explorado em crianças. O objetivo deste estudo foi estabelecer a prevalência dos padrões de celularidade do escarro em crianças com asma grave. **Método:** Crianças com diagnóstico de asma grave de acordo com GINA 2018, foram submetidas à indução de escarro por nebulização utilizando concentrações crescentes de solução salina hipertônica de 3% a 7%. O padrão citológico foi classificado em paucigranulocítico, neutrofílico, eosinofílico e misto. O controle da asma foi verificado pelo *Asthma Control Test* (ACT) e realizado espirometria com prova broncodilatadora (PBD). **Resultado:** Setenta crianças foram submetidas à indução de escarro sendo que cinquenta e dois pacientes foram incluídos, 50% meninos e média da idade 9,2 2,7 anos. Houve predomínio do padrão eosinofílico 28(54%), seguido do paucigranulocítico 14(27%), misto 8(15%) e neutrofílico 2(4%). Conforme o ACT, 28(54%) estavam com a asma não controlada ou controlada e 12(23%) tinham controle total dos sintomas. O teste cutâneo alérgico (TCA) para aeroalérgenos foi realizado em 37 crianças com positividade de 89,1% para ao menos um alérgeno e 4 (10,8%) eram polissensibilizadas. Onze (21%) apresentaram distúrbio ventilatório obstrutivo e a PBD foi positiva em 23 (45%). Houve predomínio de crianças com controle total no grupo com padrão eosinofílico (9), 3 no padrão paucigranulocítico e nenhuma criança nos padrões neutrofílico e misto, corroborando a hipótese de menor resposta ao tratamento com corticoides inalatórios nos fenótipos não eosinofílicos. A positividade ao TCA e a presença de obstrução à espirometria foi semelhante entre os grupos. **Conclusão:** Induzir o escarro em crianças com asma é possível e os padrões não eosinofílicos são uma realidade. A identificação da celularidade no escarro contribui para um tratamento personalizado e mais eficaz.

ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO: JORNAL BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA, 2019.

J Bras Pneumol. 2019;45(5):e20190060
<http://dx.doi.org/10.1590/1806-3713/e20190060>

LETTER TO THE EDITOR



Clinical, functional, and cytological evaluation of sputum in postinfectious bronchiolitis obliterans: a possible overlap with asthma?

Sarah Angélica Maia^{1,a}, Denise Eli^{2,b}, Roberta Cunha^{2,c}, Elessandra Bitencourt^{2,d}, Carlos Antônio Riedi^{1,e}, Herberto José Chong Neto^{1,f}, Débora Carla Chong e Silva^{1,g}, Nelson Augusto Rosário Filho^{1,h}

DEAR EDITOR:

Postinfectious bronchiolitis obliterans (PIBO) is a chronic obstructive pulmonary disease associated with inflammation of the lower airways. The inflammatory process is secondary to infectious bronchiolitis, which can be caused by viruses, atypical germs (especially *Mycoplasma pneumoniae*), and other bacteria.^(1,2) Although the clinical manifestations of PIBO can vary widely, its main characteristic is that patients with the condition present with signs and symptoms of a severe and persistent lower airway obstruction.⁽²⁾

The objective of the present study was to evaluate the clinical presentation, pulmonary function, CT findings, and sputum cellularity in patients with PIBO, as well as to correlate sputum cell pattern with spirometry and other imaging findings, clinical manifestations, and atopy.

This is a cross-sectional analytical study with patients diagnosed with PIBO and under follow-up at the Pediatric Pulmonology Center of the Clinical Hospital Complex of the Federal University of Paraná, Curitiba, state of Paraná, Brazil. The study included patients under 21 years of age with a diagnosis of PIBO related to a history of severe viral bronchiolitis before the onset of the respiratory symptoms and imaging studies with radiological findings showing involvement of the small airways and/or spirometry characterizing an obstructive defect. Exclusion criteria were the presence of other lung diseases, such as cystic fibrosis, primary or secondary immunodeficiencies, and other chronic pulmonary diseases.

After selection, patients underwent an initial clinical evaluation followed by complete spirometry—satisfying the acceptability and repeatability criteria established by international guidelines⁽³⁾—and post-bronchodilator (salbutamol, 400 µg) evaluation. The classification of the obstructive ventilatory defect into mild or moderate followed the recommendations of the *American Thoracic Society*.⁽⁴⁾ The bronchodilator test was considered positive when the difference in FEV₁ was greater than 12% of the predicted value, as recommended by the Global Initiative for Asthma.⁽⁵⁾ Sputum was induced via inhalation of a hypertonic saline solution, using a 2 L/min oxygen cylinder, and with the assistance of a physical

therapist. The process used a hypertonic saline solution with concentrations gradually increasing from 3% to 5% and 7%, when necessary, and lasted a minimum of 20 min per patient. After the minimum time, patients were stimulated to cough and expectorate into a sterile vial. The processes of sputum induction and sample processing followed a laboratory technique described by Pizzichini et al.⁽⁶⁾ Only samples with cell viability above 50% were considered for the analysis.⁽⁷⁾ The patterns found were divided into eosinophilic (eosinophils > 2.5% and neutrophils ≤ 54%), neutrophilic (eosinophils ≤ 2.5%, neutrophils > 54%), and mixed (eosinophilic/neutrophilic; eosinophils > 2.5% and neutrophils > 54%).⁽⁸⁾ The study was approved by the research ethics committee of the institution (Protocol No. 2.062.062). All parents/guardians gave written informed consent.

Our sample was initially composed of 23 patients with a clinical and radiological diagnosis of PIBO, who also met all other inclusion criteria. Of these, 1 patient refused to participate, and we were unable to get hold of another 9 patients. Therefore, 13 patients were enrolled in the study (8 of them male), with a median age of 12.1 years (range: 7-20 years). All 13 patients (100%) had been hospitalized in their first year of life due to a disease whose manifestations were compatible with acute viral bronchiolitis. In addition, 8 (61.5%) had a positive skin prick test for at least one aeroallergen, 7 (53.8%) had rhinitis and/or atopic dermatitis, and 9 (69.2%) were making use of inhaled corticosteroids.

All study participants had undergone at least one chest CT scan. The most prevalent CT finding was a mosaic pattern, found in 11 patients (84%); followed by bronchial wall thickening, in 10 (76%); bronchiectasis, in 4 (30%); and atelectasis, in 4 (30%).

Of the 12 participants who underwent complete spirometry, 11 (91.6%) had obstructive ventilatory defect. Of these, 7 (63.6%) were classified as mild (60% < FEV₁ < 90%) and 4 (36.4%) as moderate (40% < FEV₁ < 60%). Four patients had a positive bronchodilator test (33.3%).

As for sputum cytology, the samples of 3 patients were considered inadequate for cytology studies for not having sufficient cell viability. Of the 10 samples

1. Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR) Brasil.

2. Complexo do Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR) Brasil.

a. <http://orcid.org/0000-0002-2908-4653>; b. <http://orcid.org/0000-0003-3470-2599>; c. <http://orcid.org/0000-0001-7406-5286>;

d. <http://orcid.org/0000-0002-7501-0647>; e. <http://orcid.org/0000-0002-6044-3327>; f. <http://orcid.org/0000-0002-7960-3925>;

g. <http://orcid.org/0000-0002-7385-4598>; h. <http://orcid.org/0000-0002-8550-8051>

**Table 1.** Clinical, functional, and CT variables in relation to sputum cell pattern (N = 10).

Variables	Cell pattern		
	Neutrophilic (n = 4)	Eosinophilic/neutrophilic (n = 4)	Eosinophilic (n = 2)
Positive skin prick test	3	3	2
Daily symptoms	2	1	1
Symptoms when exercising	1	2	2
Bronchiectasis	0	2	0
Ground-glass opacities	1	2	0
Positive bronchodilator test	1	2	1

considered viable, 4 (40%) had a neutrophilic pattern; 4 (40%) had a neutrophilic/eosinophilic pattern (mixed); and 2 (20%) had an eosinophilic pattern. One of the samples was considered neutrophilic in spite of having a neutrophil rate below 54% because of its high cell viability and absence of eosinophils.

Sputum cytological patterns were compared with the CT findings, skin prick test results, presence or absence of daily symptoms and/or symptoms when exercising (especially dry cough and dyspnea), and bronchodilator test results (Table 1).

PIBO is a rare chronic lung disease resulting from severe lung injury following acute infectious bronchiolitis that causes varying degrees of inflammation with narrowing or total obliteration of the small airways in susceptible individuals.⁽⁹⁾

Supposedly, sputum cytology findings should be similar to those of previous bronchoalveolar lavages,⁽¹⁰⁾ with a marked increase in the number of neutrophils. However, only 4 patients presented an exclusively neutrophilic pattern, and, in 2, the pattern was predominantly eosinophilic, contrary to the initial assumption. Such disagreement was seen in atopic patients with a positive skin prick test and a diagnosis of concomitant rhinitis, indicating a probable coexistence of allergic asthma with previously diagnosed PIBO, an overlap suggested in a previous study.⁽¹¹⁾

The bronchodilator test turned out positive in all cytological patterns, including the exclusively neutrophilic one, corroborating studies with long-term follow-up of patients with PIBO.^(12,13) Those studies have shown severe and permanent impairment of lung function, though air trapping slowly decreased with patient growth.^(1,12,13)

There were no significant correlations between sputum cellularity and the clinical, functional, and CT variables studied. The lack of statistical correlation between the variables in the present study was probably due to the small sample size; the low prevalence of the disease represents an analytical challenge.

The lack of predominance of a specific cytological pattern could suggest a potential overlap of PIBO and asthma, which can indicate a need for new diagnostic and therapeutic approaches aimed at controlling both diseases. A deeper understanding of PIBO will favor an individualized approach of these cases. Similar multicenter studies may help deepen our understanding by providing us with the possibility of evaluating larger samples of such a rare disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to give special thanks to our medical student, Thaísa Vieira Sonnberg, for proofreading and conforming the text to the journal's standards.

REFERENCES

- Mattiello R, Vidal PC, Sarria EE, Pitrez PM, Stein RT, Mocelin HT, et al. Evaluating bronchodilator response in pediatric patients with post-infectious bronchiolitis obliterans: use of different criteria for identifying airway reversibility. *J Bras Pneumol.* 2016;42(3):174-8. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562015000000065>
- Castro-Rodriguez JA, Giubergia V, Fischer GB, Castaños C, Sarria EE, Gonzalez R, et al. Postinfectious bronchiolitis obliterans in children: the South American contribution. *Acta Paediatr.* 2014;103(9):913-21. <https://doi.org/10.1111/apa.12689>
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005;26(2):319-38. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00034805>
- Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144(5):1202-18. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/144.5.1202>
- Global Initiative for Asthma [homepage on the Internet]. Bethesda: Global Initiative for Asthma [cited 2019 Feb 01]. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018. Available from: www.ginasthma.org
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Ethimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(2 Pt 1):308-17. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.2.8756799>
- Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Miglion GB, et al. Induced sputum cellularity: Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(3 Pt 1):1172-4. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.3.9908057>
- Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Wilson NM, Hansel TT, et al. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. *Pediatr Pulmonol.* 2005;39(4):318-24. <https://doi.org/10.1002/ppul.20159>
- Mauad T, Dolhnikoff M; São Paulo Bronchiolitis Obliterans Study Group. Histology of childhood bronchiolitis obliterans. *Pediatr Pulmonol.* 2002;33(6):466-74. <https://doi.org/10.1002/ppul.10097>
- Koh YY, Jung DE, Koh JY, Kim JY, Yoo Y, Kim CK. Bronchoalveolar cellularity and interleukin-8 levels in measles bronchiolitis obliterans. *Chest.* 2007;131(5):1454-60. <https://doi.org/10.1378/chest.06-0188>
- Bandeira T, Negreiro F, Ferreira R, Salgueiro M, Lobo L, Aguiar P,

Maia AS, Eli D, Cunha R, Bitencourt E, Riedi CA, Chong Neto HJ, Chong-Silva DC, Rosário Filho NA



- et al. Clinical, radiological, and physiological differences between obliterative bronchiolitis and problematic severe asthma in adolescents and young adults: the early origins of the overlap syndrome? *Pediatr Pulmonol.* 2011;46(6):573-80. <https://doi.org/10.1002/ppul.21405>
12. Colom AJ, Maffey A, Garcia Bourmissen F, Teper A. Pulmonary function of a paediatric cohort of patients with postinfectious bronchiolitis obliterans. A long term follow-up. *Thorax.* 2015;70(2):169-74. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205328>
13. Rosewich M, Eckrich J, Zielen S. Long-term lung function in postinfectious bronchiolitis obliterans. *Thorax.* 2015;70(8):792. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-206998>



Postinfectious bronchiolitis obliterans and asthma: A misdiagnosis or overlap?

To the Editor,

We read with interest the article by Onay et al,¹ about clinical similarities of postinfectious bronchiolitis obliterans (PIBO) and asthma in pediatric population. They concluded that patients with PIBO who had initially been misdiagnosed with asthma were correctly diagnosed at older ages and had longer symptom duration. Asthma may mask PIBO diagnosis by the similarity of symptoms and the clinical response to inhaled β_2 -agonist or steroid treatment. Pulmonary function tests (PFT) are not feasible in young children. The delay in the diagnosis of PIBO is probably attributable to the fact that some clinicians fail to include PIBO in the differential diagnosis when there is no clinical response to asthma medication.¹

Bronchiolitis obliterans is defined as a chronic lung disease that definitely affects the small airways. In children, the most frequent etiology is infectious, in this case the nomenclature adopted is PIBO. Among the most common infectious agents in PIBO are adenovirus, influenza, parainfluenza, and respiratory syncytial virus. Atypical bacteria such as *Mycoplasma pneumoniae* have also been described among the etiologic agents of PIBO. The current prevalence of the disease is unknown. The diagnosis of PIBO in children under 3 years of age is based on clinical, functional, and tomographic criteria, where (a) history of acute and severe lower respiratory tract infection (LRTI), (b) evidence of persistent airway obstruction on physical examination or PFT after an acute respiratory event, and (c) imaging findings of obstructive pulmonary disease, such as hyperinflation, atelectasis, airway wall thickening, bronchiectasis, and mosaic pattern and/or air trapping on high resolution tomography.²

Asthma is the most common chronic disease in childhood and could cause significant morbidity (loss of school day, emergency room visits, hospitalization, among others). It is a heterogeneous disease usually characterized by chronic inflammation of the airways. It is defined by the history of respiratory symptoms such as wheezing, rapid and short breathing, chest tightness and cough that vary with time and intensity associated with expiratory flow variation. In general, asthma starts in the first years of life, and can be confused with other diseases, such as PIBO, which delays the institution of adequate treatment.³

There are clinical similarities between PIBO and asthma, symptoms such as wheezing, dyspnea, chest tightness and cough starting in early life and triggered mostly by virus infection.

We have conducted a study aimed to evaluate the clinical, functional, chest computed tomography (CT) findings, and sputum cytology of patients with PIBO and to correlate the sputum pattern with other variables. Twelve patients (male = 8), median age = 12.1 years (range, 7-20 years) with clinical and chest CT findings of PIBO underwent clinical evaluation, skin puncture test (SPT) for inhalant allergens, PFT and evaluation of induced sputum cytology. Until the beginning of the study, none of the patients had a diagnosis of asthma reported.

The legal guardians of 12 participating patients signed the consent term form approved by the Institutional Ethics Committee with protocol number 2.062.062. Adolescents over 12 years old, also consented to participate by signing the consent term form adapted for their age.







The most prevalent chest CT finding was the mosaic attenuation pattern. Eleven (92%) showed airflow obstruction in PFT and four patients (33.3%) had a positive bronchodilator test. Sputum cytology was classified as neutrophilic in four cases, eosinophilic in two cases, and mixed eosinophil-neutrophil in four cases.⁴ Eight (66%) had positive SPT and seven (58%) reported associated allergic diseases (rhinitis and/or dermatitis). Twelve received regular treatment: six (50%) azithromycin, nine (75%) long-acting β_2 -agonist, nine (75%) inhaled steroids, five (42%) nebulized hypertonic saline. There was no significant relationship between cytological patterns to clinical, functional, and laboratory tests. PIBO is a rare pediatric chronic obstructive airway disease that resembles the adult chronic obstructive pulmonary disease, and with poorly understood inflammatory mechanisms. This study did not show a predominant sputum cytology pattern and there was no correlation of cellularity with daily symptoms, physical exercise limitation, severity of obstructive disorder and chest CT findings. One-third of the sample presented positive bronchodilator response at spirometry and more than half presented allergic sensitization suggesting that PIBO and asthma may coexist.⁵

In conclusion, there are clinical similarities between PIBO and asthma in pediatric population and both could be misdiagnosed.

The lack of a specific cytological pattern associated to an allergic profile found in these children could indicate a potential overlap of PIBO and asthma. The determination of PIBO new biomarkers may contribute with a clear understanding and an individualized approach to these patients.

Correspondence

Débora C. Chong-Silva, MD, PhD, Department of Pediatrics,
Federal University of Paraná, Padre Camargo, 453, Alto da Glória,
Curitiba, Paraná 80.060-220, Brazil.
Email: debchong@uol.com.br

Débora C. Chong-Silva MD, PhD 
Leticia G. Botelho MD
Denise Eli Biochem 
Roberta Cunha PT 
Elessandra Bitencourt Nu, MSc
Adriana G. Nascimento MD
Ana B. Lourenço Dantas MD
Cristine S. Rosário MD, MSc
Carlos A. Riedi MD, PhD 
Herberto J. Chong-Neto MD, PhD 
Nelson A. Rosário Filho MD, PhD 

Department of Pediatrics, Federal University of Paraná, Paraná, Brazil

REFERENCES

1. Onay ZR, Gursoy TR, Aslan AT, et al. Postinfectious bronchiolitis obliterans masked by misdiagnosis as asthma. *Pediatr Pulmonol.* 2020;55:1007-1011.
2. Fischer GB, Edgar ES, Mattiello R, Mocelin HT, Castro-Rodriguez JA. Post infectious bronchiolitis obliterans in children. *Paediatr Respir Rev.* 2010;11:233-239.
3. Global Initiative for Asthma. GINA-update; 2020. www.ginasthma.org. Accessed April 2020.
4. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, et al. Induced sputum cellularity: reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(3 Pt 1):1172-1174.
5. Maia SA, Eli D, Cunha R, et al. Clinical, functional, and cytological evaluation of sputum in postinfectious bronchiolitis obliterans: a possible overlap with asthma? *J Bras Pneumol.* 2019;45:e20190060.