

Inflamação das vias aéreas em asmáticos virgens de tratamento com esteróides: características do escarro induzido*

Airway inflammation in steroid-naïve asthmatics: characteristics of induced sputum

SIMONE VAN DE SANDE LEE¹, MARCIA MARGARET MENEZES PIZZICHINI², LEILA JOHN MARQUES³ (TE SBPT), SAMIRA CARDOSO FERREIRA⁴, EMILIO PIZZICHINI⁵ (TE SBPT)

Introdução: A inflamação das vias aéreas, reconhecida como uma importante característica da asma, pode ser avaliada através do exame do escarro induzido.

Objetivo: Determinar o padrão de células inflamatórias no escarro de asmáticos estáveis virgens de tratamento com corticosteróides, em Florianópolis, Santa Catarina.

Método: Analisou-se o escarro induzido de 34 asmáticos em uso exclusivo de broncodilatadores inalatórios por demanda. As características clínicas dos mesmos foram obtidas na visita 1 e o escarro foi induzido na visita 2. A contagem diferencial de células foi realizada em citospinas coradas pelo Giemsa. O escarro foi considerado eosinofílico na presença de $\geq 3\%$ de eosinófilos e neutrofílico na presença de $\geq 65\%$ de neutrófilos.

Resultados: Os resultados são expressos através da mediana e amplitude do semiquartil. A contagem celular total foi de $3,4 (3,7) \times 10^6$ células/ml e a viabilidade celular, de $80,0 (16,4)\%$. A proporção de neutrófilos foi de $14,4 (22,1)\%$; de eosinófilos, $6,4 (17,2)\%$; de macrófagos, $60,3 (37,5)\%$; e de linfócitos, $1,1 (1,2)\%$. Escarro eosinofílico foi observado em 24 participantes ($70,6\%$); nenhum apresentou escarro neutrofílico. Não houve diferença significativa entre os grupos eosinofílico e não-eosinofílico quanto aos desfechos clínicos medidos, contagem total e proporções de células no escarro, com exceção da proporção de eosinófilos ($14,4 [19,3]$ vs. $0,4 [1,1]$, $p < 0,001$).

Conclusões: Asmáticos virgens de tratamento com corticosteróides, em nosso meio, apresentam maior proporção de eosinófilos no escarro em relação a valores de referência estabelecidos. Os parâmetros clínicos e fisiológicos analisados foram incapazes de prever a presença de inflamação eosinofílica das vias aéreas. (*J Pneumol* 2003;29(4):188-95)

Descritores – Asma. Inflamação. Escarro. Eosinófilos. Neutrófilos.

Background: Airway inflammation, acknowledged as an important feature of asthma, can be assessed by the examination of induced sputum.

Objective: To determine the pattern of inflammatory cells in induced sputum from stable steroid-naïve asthmatics, in Florianópolis, Santa Catarina.

Method: The induced sputum from 34 asthmatics using exclusively inhaled bronchodilators on demand was examined. The patients' clinical characteristics were obtained at visit 1, and sputum was induced at visit 2. Differential cell count was performed on Giemsa-stained cytopins. Sputum was considered to be eosinophilic if there were $\geq 3\%$ eosinophils, and neutrophilic if there were $\geq 65\%$ neutrophils.

Results: Results are expressed by median and interquartile range. The total cell count was $3.4 (3.7) \times 10^6$ cells/ml, and cell viability was $80.0 (16.4) \%$. The proportion of neutrophils was $14.4 (22.1) \%$, of eosinophils $6.4 (17.2) \%$, of macrophages $60.3 (37.5) \%$, and of lymphocytes $1.1 (1.2) \%$. Eosinophilic sputum was observed in 24 subjects (70.6%); none of them had neutrophilic sputum. There were no significant differences between the eosinophilic and non-eosinophilic groups concerning the measured clinical outcomes, total cell count and proportions of cells in the sputum, except for the proportion of eosinophils ($14.4 [19.3]$ vs $0.4 [1.1]$, $p < 0.001$).

Conclusions: In our environment, steroid-naïve asthmatics present a higher proportion of sputum eosinophils, as compared to the established reference values. The clinical and physiological parameters analyzed were unable to predict the presence of eosinophilic inflammation of the airways.

Key words – Asthma. Inflammation. Sputum. Eosinophils. Neutrophils.

* Trabalho realizado no Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas (Nupaiva), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

1. Acadêmica do 6º ano de Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina.
2. Doutora em Pneumologia. Professora da Disciplina de Clínica Médica da Universidade Federal de Santa Catarina.
3. Doutora em Pneumologia. Médica Pneumologista do Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina. Título de especialista pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

4. Farmacêutica e Bioquímica do Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina.
5. Doutor em Pneumologia. Professor da Disciplina de Pneumologia da Universidade Federal de Santa Catarina e coordenador do Nupaiva. Título de especialista pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

Endereço para correspondência – Prof. Dr. Emilio Pizzichini, Nupaiva – Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas, Hospital Universitário da UFSC – 88040-970 – Florianópolis, SC. Tel. (48) 234-7711; fax (48) 223-0675; e-mail: pizzich@mcmaster.ca

Recebido para publicação em 20/9/02. Aprovado, após revisão, em 17/4/03.

INTRODUÇÃO

Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que, em indivíduos suscetíveis, causa episódios recorrentes de sibilância, falta de ar, opressão torácica e tosse, particularmente à noite ou de madrugada. Esses episódios normalmente se associam a limitação difusa, porém variável ao fluxo de ar (broncoconstrição), que é, em geral, reversível espontaneamente ou com tratamento. A inflamação também causa aumento na responsividade das vias aéreas (hiper-responsividade) a uma variedade de estímulos inespecíficos.^(1,2) A importância da busca de maior compreensão sobre a fisiopatologia da asma reside em suas implicações em relação ao diagnóstico, terapêutica e prevenção da doença, que constitui importante problema de saúde pública, conforme comprovado por diversos estudos. Um dos mais recentes, o *International Study of Asthma and Allergy in Children* (ISAAC),⁽³⁾ foi realizado em 56 países, com escolares de seis a sete anos e adolescentes de 13 a 14 anos e mostrou prevalências de sintomas de asma que variaram desde 1,6 até 36,8% entre os diversos países, sendo que o Brasil esteve entre os oito países com maior prevalência (entre 17 e 27%).

Até recentemente, o conhecimento a respeito dos mecanismos da asma limitava-se à ocorrência de broncoespasmo, que se acreditava ser conseqüente a fatores principalmente relacionados à musculatura lisa dos brônquios. As alterações inflamatórias, observadas em estudos de necropsia em pacientes que haviam morrido após grave exacerbação, eram atribuídas aos eventos terminais da doença.⁽⁴⁾ A exploração das vias aéreas de pacientes asmáticos em vida só foi possível a partir da década de 80, através da introdução da broncoscopia para obtenção de amostras de tecido brônquico e do líquido do lavado broncoalveolar, e só então foi verificado que muitas daquelas alterações estavam presentes mesmo em formas leves da doença.^(5,6) Esses métodos mostraram-se válidos para a avaliação da inflamação das vias aéreas;^(7,8) no entanto, por serem invasivos, onerosos e restritos a pacientes com asma estável de gravidade leve a moderada, não obtiveram espaço na prática clínica.⁽⁹⁾ A partir daí, outros métodos menos invasivos e, portanto, mais seguros foram introduzidos, sendo o principal deles a avaliação de células e marcadores inflamatórios no escarro, obtido de forma espontânea⁽¹⁰⁾ ou induzido através da inalação de uma solução salina hipertônica.⁽¹¹⁾

Os métodos para obtenção e análise do escarro vêm evoluindo nos últimos 13 anos. Suas propriedades em diversos estudos mostraram-se excelentes, particularmente quando o escarro é separado da saliva.⁽¹²⁾ O exame foi considerado válido, tornando possível a discriminação entre diferentes condições clínicas e entre asmáticos sin-

Siglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho

ASQ – Amplitude do semiquartil
ATS – *American Thoracic Society*
BD – Broncodilatador
CCT – Contagem celular total
CP₂₀ – Concentração provocativa de metacolina capaz de produzir uma queda no VEF₁ de 20%
CVF – Capacidade vital forçada
D-PBS – Solução salina tamponada em fosfato de Dulbecco
DP – Desvio padrão
DTT – Ditiotreitól
ECP – Proteína catiônica eosinofílica
ISAAC – *International Study of Asthma and Allergy in Children*
NUPAIVA – Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas
Prev – Previsto
SUS – Sistema Único de Saúde
VEF₁ – Volume expiratório forçado no 1º segundo

tomáticos e não sintomáticos, além de correlacionar-se com os índices espirométricos e a responsividade das vias aéreas a estímulos inespecíficos como a metacolina.⁽¹¹⁾ Seus resultados são reprodutíveis, com exceção do número total de células e da proporção de linfócitos, conforme demonstrado através da comparação dos resultados entre repetidas amostras de escarro de asmáticos estáveis obtidas em diferentes dias durante uma semana.⁽¹¹⁾ Com modificações na metodologia de processamento do escarro, a contagem total de células agora mostra-se também reprodutível. Outra característica observada foi a responsividade dos marcadores examinados no escarro a intervenções; constatou-se que a resposta inflamatória no escarro aumenta após a exposição a alérgenos inaláveis⁽¹³⁾ e após exacerbação dos sintomas,⁽¹⁴⁾ e diminui após tratamento com corticosteróides.^(15,16) O método tem ainda a vantagem adicional de poder ser aplicado mesmo em situações de exacerbação grave.^(15,17) A inflamação das vias aéreas também pode ser avaliada, de forma indireta, através da contagem de eosinófilos e dosagem de proteína catiônica eosinofílica (ECP) no sangue periférico; no entanto, a acurácia e a especificidade do exame do escarro mostraram ser significativamente maiores.⁽¹⁸⁾

Vários estudos, através da mensuração direta da inflamação das vias aéreas, vêm contribuindo para a elucidação da patogênese da asma. Dessa forma, à luz dos conhecimentos atuais, a inflamação é reconhecida como sua causa primária, determinando gravidade da doença, exacerbações e alterações estruturais. Estas podem ser persistentes, resultando em um processo conhecido como “remodelamento”, que culmina em irreversibilidade da obstrução ao fluxo aéreo.⁽¹⁹⁾

Uma característica importante da inflamação na asma é a presença de infiltrado eosinofílico nas vias aéreas.^(11,15)

No entanto, nem todos os asmáticos apresentam esse tipo de resposta inflamatória e nem todas as exacerbações da asma são acompanhadas por aumento dessas células no escarro.^(17,20,21) Essa observação possui implicações terapêuticas, já que há estreita correlação entre presença de eosinofilia e resposta à terapia com corticosteróides. Por exemplo, estudos recentes constataram que pacientes que apresentaram escarro eosinofílico obtêm benefícios clínicos significativamente maiores com esse tipo de droga, quando comparados com aqueles com escarro não-eosinofílico.^(22,23) Por outro lado, os índices indiretos da inflamação (presença de sintomas, obstrução ao fluxo aéreo e hiper-responsividade das vias aéreas a diversos estímulos), utilizados na prática clínica para conduzir a terapêutica, são inespecíficos e correlacionam-se de forma variável entre si e com os índices diretos,⁽²⁴⁻²⁶⁾ o que pode resultar em condutas equivocadas. Outro tipo de resposta inflamatória observada em alguns asmáticos é a neutrofílica, que pode estar relacionada, por exemplo, à exposição à fumaça do cigarro, exposição a elevadas concentrações de ozônio, óleo diesel ou a diferentes tipos de infecção, incluindo virais.^(21,27-29)

Asmáticos sintomáticos não controlados, virgens de tratamento com corticosteróides inalatórios, apenas em uso de tratamento sintomático (broncodilatadores) ainda constituem a grande maioria da população de asmáticos vistos no Brasil e são comumente encontrados em nosso meio. Esses pacientes são vistos com frequência nas emergências e ambulatórios de nossos hospitais. No presente estudo objetivamos determinar o padrão do infiltrado celular inflamatório observado no escarro induzido de asmáticos estáveis, não controlados e virgens de tratamento com corticosteróides em nosso meio e comparar as características clínicas entre grupos de indivíduos de acordo com a presença ou não de inflamação eosinofílica, detectada pelo exame do escarro.

MÉTODOS

Participantes

Participaram do estudo, de forma consecutiva, 34 adultos asmáticos não controlados com idade entre 18 e 67 anos, atópicos ou não atópicos, em uso exclusivo de broncodilatadores inalatórios por demanda. As características dos mesmos encontram-se descritas na Tabela 1. O diagnóstico de asma foi indicado pela presença, no último ano, de sintomas episódicos de sibilância, sensação de opressão torácica, tosse e dispnéia, e confirmado em 33 participantes através da verificação de obstrução reversível do fluxo aéreo (volume expiratório forçado no 1º segundo [VEF₁] menor do que 70% do valor predito, com melhora no VEF₁ de no mínimo 15% após inalação de 200µg de salbutamol inalado através de espaçador) e, em

TABELA 1
Características dos participantes

Características	Resultados
Participantes (n)	34
Idade (anos)	34,8 (13,7)*
Sexo (masculino)	14
Atopia (n)**	21
Tabagismo (ex)	6
VEF ₁ pré-BD (L)	2,2 (0,67)*
VEF ₁ pré-BD (% pred)***	64,9 (10,5)*
VEF ₁ pós-BD (L)	2,7 (0,83)*
VEF ₁ pós-BD (% pred)***	78,1 (11,6)*
VEF ₁ /CVF pré-BD	61,3 (9,6)*
VEF ₁ /CVF pós-BD	70,9 (18,5)*
Δ BD (L)	0,54 (0,37)*
Δ BD (%)	26,0 (16,5)*

* Dados expressos através da média e desvio padrão. ** Participantes com um ou mais resultados positivos nos testes cutâneos. *** Valores preditos de VEF₁ obtidos de Crapo *et al.*⁽³³⁾ VEF₁ = Volume expiratório forçado no 1º segundo. BD = Broncodilatador. Pred = Valor predito. CVF = Capacidade vital forçada. Δ BD = Diferença entre VEF₁ pós-BD e VEF₁ pré-BD.

apenas um participante, através da presença de hiper-responsividade das vias aéreas à metacolina (concentração provocativa de metacolina capaz de produzir queda de 20% no VEF₁ [CP₂₀] menor do que 8mg/ml).

Todos os participantes eram não-fumantes ou ex-fumantes por tempo superior a um ano. Nenhum deles havia sido medicado com esteróides sistêmicos ou inalatórios nos últimos dois meses, nem apresentara história de resfriado ou outra infecção respiratória nas últimas seis semanas antes de sua inclusão no estudo. Foram excluídos do estudo os indivíduos com qualquer outra doença pulmonar associada (exemplo: bronquiectasias, pneumonia, etc.). Todos os participantes foram capazes de produzir escarro não purulento após indução com inalação de solução salina hipertônica.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina e todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado.

Delineamento do estudo

Este é um estudo descritivo transversal. O estudo incluiu consecutivamente todos os indivíduos que participaram da triagem de um ensaio clínico placebo controlado, que pretendia comparar os efeitos antiinflamatórios do dipropionato de fluticasona e do antagonista dos receptores para leucotrienos, o montelucaste, em asmáticos com bronquite eosinofílica.⁽³⁰⁾ Todos foram atendidos no Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas (NUPAIVA), do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, Florianópolis, Santa Catarina.

O estudo foi detalhadamente explicado a cada participante. Os que aceitaram colaborar foram atendidos no laboratório de pesquisa clínica do NUPAIVA em duas visitas consecutivas, com intervalo de aproximadamente 48 horas entre as mesmas. Na primeira visita, após o consentimento informado por escrito, foi aplicado um questionário para a obtenção das características individuais do participante. Foram realizados testes alérgicos cutâneos por puntura, se não feitos previamente nos últimos 12 meses no laboratório de pesquisa, além de espirometria, com medida da reversibilidade da obstrução das vias aéreas ou teste de broncoprovocação com metacolina, se necessário. Na segunda visita os participantes foram submetidos a nova espirometria e a indução de escarro. O escarro foi examinado por um profissional cego às características clínicas dos participantes.

Procedimentos clínicos e laboratoriais

As características dos participantes foram documentadas através de um questionário estruturado que incluía dados como idade, sexo, altura, história de tabagismo, infecção respiratória nas últimas seis semanas, sintomas e sua gravidade (determinada através da frequência dos sintomas, presença ou não de sintomas noturnos provocando despertares, frequência do uso de broncodilatadores inalatórios), história passada ou presente de outra doença respiratória e tratamentos presentes ou passados.

Os testes cutâneos de alergia foram realizados pela técnica de puntura modificada⁽³¹⁾ usando 19 extratos alérgênicos inalatórios comuns. A leitura foi feita após 15 minutos, registrando-se o diâmetro médio da circunferência em milímetros. O teste foi considerado positivo para um determinado alérgeno quando houve formação de pápula com diâmetro maior ou igual a 3mm. Atopia foi definida pela presença de uma ou mais respostas positivas.

A espirometria foi executada de acordo com as especificações da *American Thoracic Society* (ATS),⁽³²⁾ utilizando-se um espirômetro computadorizado (*Koko® Spirometer*, PDS Instrumentation, Louisville, USA). Foi registrado como VEF₁ basal o melhor entre três valores reprodutíveis e com amplitude inferior a 5%. Naqueles com VEF₁ menor do que 70% do predito, a reversibilidade foi comprovada 15 minutos após a inalação de 200µg de salbutamol liberados através de um dispositivo pressurizado com dose medida e administrados com auxílio de um espaçador (*Aerochamber®*, Trudell Medical International, London, On, Canada). Os valores preditos foram obtidos de *Crapo et al.*⁽³³⁾

Os testes de broncoprovocação com metacolina, quando indicados, foram realizados pelo método descrito por *Juniper et al.*⁽³⁴⁾ Os resultados foram expressos através da CP₂₀ em unidades não cumulativas.

O escarro foi induzido de acordo com o método descrito por *Pizzichini et al.*⁽¹⁵⁾ Em síntese, o procedimento consistiu da inalação de um aerossol de solução salina isotônica (0,9%) seguida por solução salina hipertônica (3, 4 e 5%), produzido por um nebulizador ultra-sônico *Fisoneb®* (Canadian Medical Products, Ltd., Markham, Ontario) com débito de 0,87ml/min e partículas com diâmetro aerodinâmico de massa mediano de 5,58µm. A inalação do aerossol foi mantida por um ou dois minutos, de acordo com a gravidade da broncoconstrição presente antes do procedimento, seguida pela mensuração do VEF₁. Os participantes foram orientados a enxaguar a boca, engolir a água e assoar o nariz para minimizar a contaminação com saliva ou descarga pós-nasal. A seguir, foram instruídos a tossir e depositar o escarro em um recipiente estéril. Esses procedimentos foram consecutivamente repetidos, aumentando-se a concentração da solução a cada sete minutos, até completar 21 minutos ou até que queda do VEF₁ de 20% ou mais ocorresse.

O escarro foi processado dentro de duas horas, pela técnica descrita por *Pizzichini et al.*⁽¹¹⁾ Inicialmente, as porções densas do material expectorado foram selecionadas a olho nu ou, se necessário, sob visualização através de um microscópio invertido, usando-se um fórceps de 115mm para separar o escarro da saliva. A fração selecionada foi colocada em um tubo de poliestireno de 15ml e tratada com quatro vezes o seu volume de ditioneitol (DTT) a 0,1% (*Sputalysin 10%*; Calbiochem Corp., San Diego, CA); a mistura foi agitada por 15 segundos e consecutivamente aspirada e ejetada através de uma pipeta de Pasteur. O tubo de poliestireno foi então colocado em um agitador de mesa (*Dade Tube Rocker*; Baxter Diagnostics Corporation, Miami, FL) e agitada por 15 minutos. Para sustar o efeito do DTT sobre a suspensão de células, foi adicionado mais quatro vezes o volume de solução salina tamponada em fosfato de Dulbecco (D-PBS). A suspensão resultante foi filtrada através de um filtro de náilon com microporos de 48µm (*BBS Thompson*, Scarborough, Ontario) para remover os restos celulares e o muco não dissolvido. Em seguida, foi realizada a contagem celular total de leucócitos, excluindo-se as células escamosas utilizando-se um hemocítmetro de Neubauer modificado, e a viabilidade celular foi determinada através do método de exclusão pelo *trypan blue* (as células mortas aparecem em azul). Sessenta a oitenta microlitros da suspensão, ajustada para 1,0 x 10⁶/ml, foram colocados em recipientes para citocentrífuga *Shandon III* (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) e quatro citospinas codificadas foram preparadas a 450rpm por 6min. Depois de secar ao ar livre, as citospinas foram coradas pelo corante de Giemsa para a contagem diferencial de células, sendo que 400 células não escamosas foram contadas na lâmina de melhor qualidade. Os resultados fo-

ram expressos como percentagem do total de células não escamosas.

O escarro foi considerado eosinofílico na presença de contagem diferencial de eosinófilos maior ou igual a 3,0% e neutrofílico, na presença de contagem diferencial de neutrófilos maior ou igual a 65%. Esses pontos de corte foram estabelecidos com base nos valores normais relatados por Belda *et al.*⁽³⁵⁾

Análise estatística

Os dados de distribuição normal encontram-se sumarizados como média e desvio padrão (DP) e aqueles de distribuição não normal (por exemplo, contagem total e diferencial de células) encontram-se sumarizados como mediana e amplitude do semiquartil (ASQ). As diferenças entre os grupos, para variáveis contínuas, foram analisadas através do teste *t* não pareado; variáveis de distribuição não normal sofreram transformação logarítmica antes

da aplicação do teste. Para variáveis categóricas (sintomas), as diferenças entre os grupos foram estimadas pelo teste do qui-quadrado. A significância foi aceita ao nível de 95%.

RESULTADOS

As características celulares do escarro dos participantes encontram-se descritas na Tabela 2. A presença de eosinofilia no escarro foi observada em 24 (70,6%) dos 34 participantes. Nenhum dos participantes apresentou escarro neutrofílico. Os participantes foram subdivididos em dois grupos, de acordo com a presença ou não de eosinofilia no escarro. As características clínicas de cada grupo foram comparadas (Tabela 3). A ocorrência de sintomas diurnos e noturnos foi mais prevalente no grupo eosinofílico (79,2% vs. 50,0%), porém essa diferença não atingiu significância estatística. A frequência do uso de

TABELA 2
Características celulares do escarro de todos os participantes (todos) e dos mesmos divididos de acordo com a presença (eosinofílicos) ou ausência (não eosinofílicos) de eosinofilia no escarro

Características	Todos*	Eosinofílicos*	Não-eosinofílicos*	P
Viabilidade (%)	80,0 (16,4)	81,1 (14,5)	76,0 (24,2)	0,83
CCT (x10 ⁶ /ml)	3,4 (3,7)	3,4 (10,5)	3,5 (3,7)	0,72
Neutrófilos (%)	14,4 (22,1)	17,1 (24,4)	11,3 (23,1)	0,23
Eosinófilos (%)	6,4 (17,2)	14,4 (19,3)	0,4 (1,1)	< 0,001
Macrófagos (%)	60,3 (37,5)	58,4 (30,6)	79,6 (41,2)	0,37
Linfócitos (%)	1,1 (1,2)	1,1 (2,4)	1,3 (2,3)	0,53

* Resultados expressos através da mediana e amplitude do semiquartil. CCT = Contagem celular total.

TABELA 3
Características clínicas dos participantes classificados de acordo com a presença (eosinofílicos) ou ausência (não eosinofílicos) de eosinofilia no escarro

Características	Eosinofílicos	Não-eosinofílicos	P
Participantes (n)	24	10	
Sintomas diurnos + noturnos	79,2%	50,0%	0,12
Uso de BD de ação curta (jatos/dia)	4,3 (3,4)*	3,5 (2,3)*	0,32
VEF ₁ pré-BD (L)	2,2 (0,7)*	2,1 (0,6)*	0,26
VEF ₁ pré-BD (% pred)**	63,6 (9,6)*	67,8 (12,4)*	0,48
VEF ₁ pós-BD (L)	2,7 (0,9)*	2,7 (0,8)*	0,35
VEF ₁ pós-BD (% pred)**	78,9 (10,8)*	76,0 (13,8)*	0,42
VEF ₁ /CVF pré-BD	60,1 (9,3)*	64,2 (10,1)*	0,43
VEF ₁ /CVF pós-BD	72,4 (18,6)*	67,3 (18,7)*	0,49
Δ BD (L)	0,5 (0,4)*	0,6 (0,4)*	0,77
Δ BD (%)	24,1 (14,7)*	30,4 (28,4)*	0,78

* Dados expressos através da média e desvio padrão. ** Valores preditos de VEF₁ obtidos de Crapo *et al.*⁽³³⁾ BD = Broncodilatador. VEF₁ = Volume expiratório forçado no 1^o segundo. Pred = Valor predito. CVF = Capacidade vital forçada. Δ BD = Diferença entre VEF₁ pós-BD e VEF₁ pré-BD.

broncodilatadores inalatórios, a magnitude da obstrução de vias aéreas e a resposta ao broncodilatador mostraram-se similares entre os dois grupos.

Da mesma forma, com exceção da proporção de eosinófilos, não foram observadas diferenças na contagem total e nas proporções de células no escarro dos grupos eosinofílico e não-eosinofílico (Tabela 2).

DISCUSSÃO

No presente estudo descrevemos as características do processo inflamatório das vias aéreas de indivíduos asmáticos virgens de tratamento com corticosteróides como medido através da contagem total e diferencial de células no escarro. Os resultados mostraram a presença de escarro eosinofílico em 70,6% dos participantes; nenhum apresentou escarro neutrofilico. Não houve diferenças significativas entre os grupos eosinofílico e não-eosinofílico quanto aos sintomas, uso de broncodilatadores, presença de obstrução das vias aéreas ou resposta ao broncodilatador. Esses resultados sugerem que os parâmetros clínicos e fisiológicos analisados nem sempre refletem a presença ou ausência de inflamação eosinofílica na asma.

Apesar de vários outros trabalhos terem incluído em suas amostras asmáticos virgens de tratamento com corticosteróides,^(16,28,36,37) este é o primeiro estudo no Brasil que teve como objetivo principal descrever as características celulares do escarro desse grupo de indivíduos. O poder do estudo baseia-se em dois aspectos. O primeiro é a seleção criteriosa dos participantes, que possibilitou a obtenção de um grupo de asmáticos estáveis, em uso exclusivo de broncodilatadores inalatórios conforme a necessidade. O segundo é o método utilizado para o exame do escarro, que fornece medidas altamente reprodutíveis dos marcadores celulares, válidas e discriminativas entre diferentes condições, tipos e gravidades de processos inflamatórios das vias aéreas.⁽¹¹⁾

Uma das limitações do nosso estudo é que seus resultados não podem ser extrapolados para populações de outros locais. É preciso considerar as peculiaridades do grupo por nós analisado. Este foi composto de moradores de uma cidade de médio porte, situada em uma ilha, em que a atividade industrial não é predominante. O local onde o estudo foi conduzido apresenta, portanto, condições atmosféricas próprias. Sabe-se que a poluição atmosférica pode levar a aumento do número de macrófagos⁽³⁸⁾ ou neutrófilos^(39,40) no escarro. Outra limitação a ser destacada é a falta de um grupo controle de indivíduos hígidos, o que impossibilita a comparação das características analisadas entre grupos expostos a fatores ambientais semelhantes.

Nesse sentido, comparamos nossos resultados (Figura 1) com os únicos valores de referência publicados em in-

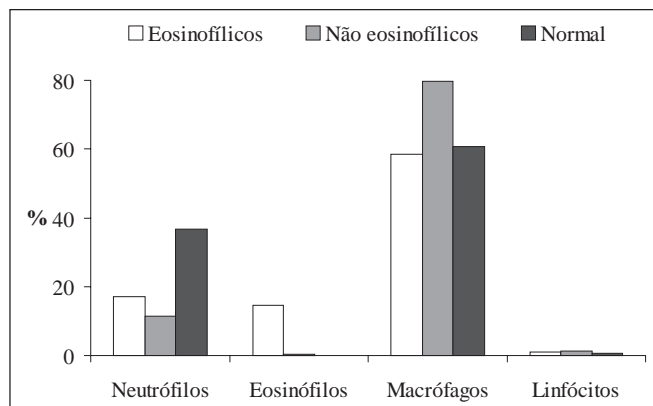


Figura 1 – Comparação da proporção de células inflamatórias no escarro induzido em nossa amostra com valores de referência para indivíduos hígidos, publicados por Belda et al.⁽³⁵⁾

divíduos hígidos (Belda *et al.*)⁽³⁵⁾ e com valores descritos em outros estudos.^(11,28) Observamos que as coortes de asmáticos, nos diversos estudos, recebendo ou não tratamento com corticosteróides, apresentam maiores proporções de neutrófilos em relação à nossa amostra. Uma possível explicação para menor proporção de neutrófilos em nossa amostra pode estar relacionada a fatores ambientais e ao nível de poluição ambiental. A maioria desses estudos foi realizada em cidades industriais, com maiores níveis de poluição ambiental, o que pode, conforme mencionado anteriormente, explicar os diferentes resultados. Não dispomos, entretanto, de valores de referência específicos do perfil celular do escarro induzido de indivíduos hígidos e normais em nosso meio; a realização de estudos para determiná-los seria interessante.

Não foram observadas, neste estudo, diferenças com relação aos sintomas, uso de broncodilatadores e magnitude da obstrução das vias aéreas entre os grupos eosinofílico e não-eosinofílico. Nossos resultados são semelhantes aos descritos por Pavord *et al.*,⁽²³⁾ que analisaram a resposta aos corticosteróides em pacientes até então virgens de tratamento com essa droga. Os grupos eosinofílico e não-eosinofílico apresentaram valores basais similares do VEF₁ (percentagem do predito), da razão entre o VEF₁ e a capacidade vital forçada (VEF₁/CVF) e dos escores de sintomas. Por outro lado, no estudo realizado por Turner *et al.*⁽²⁰⁾ com pacientes asmáticos em uso ou não de tratamento com corticosteróides durante uma exacerbação leve dos sintomas, apesar de não se terem observado diferenças quanto à prevalência de sintomas, a obstrução das vias aéreas foi significativamente maior no grupo eosinofílico. Essa discordância deve-se, provavelmente, às diferenças entre as populações estudadas.

É importante destacar que, em nosso estudo, restringimo-nos a questionar a frequência dos sintomas e a pre-

sença ou não de sintomas noturnos provocando despertares, sem discriminá-los ou caracterizá-los. Esse pode ter sido o motivo pelo qual não se observaram diferenças entre os grupos estudados. Para exemplificar, podemos citar uma entidade denominada bronquite eosinofílica, caracterizada pela presença de tosse crônica e eosinofilia no escarro, porém, sem evidência de limitação variável ao fluxo de ar das vias aéreas ou hiper-responsividade brônquica.^(41,42) O tratamento com corticosteróides produz diminuição do número de eosinófilos no escarro e melhora da tosse nesses indivíduos.^(42,43) Se tivéssemos estudado os sintomas de forma mais detalhada, em especial o sintoma “tosse”, talvez encontrássemos diferenças significativas em relação a essas variáveis entre os grupos eosinofílico e não-eosinofílico. Essa hipótese requer futuras e mais bem detalhadas investigações.

Outra questão a ser discutida é o ponto de corte por nós utilizado para definir a presença de eosinofilia no escarro. Optamos pelo valor de 3%, com base em dados publicados em alguns estudos. Belda *et al.*⁽³⁵⁾ mostraram, a partir da análise do escarro induzido de um grupo de 96 indivíduos hígidos, que as proporções normais de eosinófilos no escarro chegam até a 2,2%. Além disso, observou-se que indivíduos que apresentam proporção de eosinófilos no escarro maior ou igual a 3% respondem favoravelmente à terapia com corticosteróides, diferentemente daqueles que apresentam escarro não-eosinofílico.^(22,23) Dessa forma, podemos afirmar com segurança que valores acima desse ponto de corte associam-se à presença de inflamação eosinofílica das vias aéreas. No entanto, é preciso considerar que, pelo método por nós utilizado para processar as amostras de escarro, apenas 400 células do total de células da amostra são contadas em cada citospina corada pelo Giemsa. Esse número faz com que, na verdade, proporções de eosinófilos entre 2 e 3% difiram apenas por uma ou duas células no número total de células contado. Sendo assim, é possível que proporções ligeiramente inferiores a 3% tenham sido encontradas em algumas citospinas, mesmo na presença de uma amostra de escarro eosinofílico. Contudo, acreditamos que esse erro, intrínseco do método, não ocorra com frequência e não seja por si próprio um fator de confusão nos resultados de estudos com intervenção.

Podemos concluir que asmáticos virgens de tratamento com corticosteróides, em nosso meio, apresentam maior proporção de eosinófilos no escarro em relação a valores de referência estabelecidos, e que os desfechos clínicos e fisiológicos são incapazes de prever a presença ou ausência de inflamação eosinofílica das vias aéreas. O infiltrado eosinofílico por nós descrito é característico da asma e foi relatado em diversos estudos.^(11,14,15) Contudo, vale ressaltar que a maioria desses estudos foi realizada tendo como fator de inclusão a proporção de eosinó-

filos em determinado momento, de modo transversal, e não houve preocupação com relação à sua variabilidade ao longo do tempo e com os fatores que podem alterar suas proporções. Nesse sentido, a realização de estudos longitudinais é necessária, para avaliar a variabilidade da proporção de eosinófilos no escarro. Mais ainda, é obrigatório testar a utilidade dessa informação, determinando em que proporção a resposta ao uso de corticosteróides inalatórios na asma pode ser predita pela presença de eosinofilia no escarro.⁽⁴⁴⁾

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos pacientes que se dispuseram a participar do estudo, às enfermeiras do NUPAIVA, Janara Voltolini Maia e Cristiane Cinara Rocha, por terem auxiliado na coleta dos dados e na indução do escarro, e à Sra. Célia Tania Zimmermann, por ter processado as amostras de escarro.

REFERÊNCIAS

1. Partridge MR. Asthma: clinical features, diagnosis and treatment. In: Albert R, Spiro S, Jett J, editors. *Comprehensive Respiratory Medicine*. London: Mosby, 1999;41:1-18.
2. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention* NHLBI/WHO Workshop Report. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, 1995.
3. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998;351:1225-32.
4. Pizzichini MMM, Pizzichini E. Inflamação das vias aéreas na asma. In: Silva LCC, editor. *Conduitas em pneumologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001;265-70.
5. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:599-606.
6. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:434-57.
7. Kirby JG, Hargreave FE, Gleich GJ, O'Byrne PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:379-83.
8. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, et al. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:863-71.
9. Djukanovic R, Wilson JW, Lai CKW, Holgate ST, Howarth PH. The safety aspects of fiber-optic bronchoscopy, bronchoalveolar lavage, and endobronchial biopsy in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:772-7.
10. Pizzichini MMM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:866-9.
11. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis 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;154:308-17.
12. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of

- selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996;9:1174-80.
13. Pin I, Freitag AP, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Watson RM, Dolovich J, et al. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:1265-9.
 14. Gibson PG, Wong BJ, Hepperle MJ, Kline PA, Girgis-Gabardo A, Guyatt G, et al. A research method to induce and examine a mild exacerbation of asthma by withdrawal of inhaled corticosteroid. *Clin Exp Allergy* 1992;22:525-32.
 15. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1501-8.
 16. Jatakanon A, Kharitonov S, Lim S, Barnes PJ. Effect of differing doses of inhaled budesonide on markers of airway inflammation in patients with mild asthma. *Thorax* 1999;54:108-14.
 17. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 1995;98:1031-9.
 18. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:539-44.
 19. Fish JE, Peters SP. Airway remodeling and persistent airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:509-16.
 20. Turner MO, Hussack P, Sears MR, Dolovich J, Hargreave FE. Exacerbations of asthma without sputum eosinophilia. *Thorax* 1995;50:1057-61.
 21. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Hargreave FE. Induced sputum in the management of asthma. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 1998;19:581-92.
 22. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1511-7.
 23. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet* 1999;353:2213-4.
 24. Kendrick AH, Higgs CMB, Whitfield MJ, Laszlo G. Accuracy of perception of severity of asthma: patients treated in general practice. *BMJ* 1993;307:422-4.
 25. int'Veen JCCM, Smits HH, Ravensberg AJJ, Hiemstra PS, Sterk PJ, Bel EH. Impaired perception of dyspnea in patients with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1134-41.
 26. Parameswaran K, Pizzichini E, Pizzichini MMM, Hussack P, Efthimiadis A, Hargreave FE. Clinical judgement of airway inflammation versus sputum cell counts in patients with asthma. *Eur Respir J* 2000;15:486-90.
 27. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Efthimiadis A, Chauhan AJ, Johnston SL, Hussack P, et al. Asthma and natural colds: inflammatory indices in induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1178-84.
 28. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1999;54:1061-9.
 29. Nordenhall C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandström T, Aderoth E. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J* 2000;15:1046-51.
 30. Jayaram L, Pizzichini MMM, Hussack P, Efthimiadis A, Goodwin S, Chaboillez S, et al. First line antiinflammatory treatment for asthma: inhaled steroid or leukotriene antagonist? *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:S245.A746.
 31. Pepys J. Skin tests in diagnosis. In: Gell PGH, Coombs RRD, Lachman PJ, editors. *Clinical aspects of immunology*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975:55-88.
 32. American Thoracic Society. Standardization of spirometry: 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1107-36.
 33. Crapo RO, Morris AH, Gardner RM. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. *Am Rev Respir Dis* 1981;123:659-64.
 34. Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and methacholine inhalation tests: a laboratory tidal breathing protocol. 2nd ed. Lund, Sweden: Astra Draco AB, 1994.
 35. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:475-8.
 36. Fahy JV, Boushey HA. Effect of low dose beclomethasone dipropionate on asthma control and airway inflammation. *Eur Respir J* 1998;11:1240-7.
 37. Lim S, Jatakanon A, John M, Gilbey T, O'Connor BJ, Chung KF, et al. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation: assessment by various inflammatory markers in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:22-30.
 38. Nobutomo K. Air pollution and cytological changes in sputum. *Lancet* 1978;1:523-6.
 39. Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:981-8.
 40. Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GKK, et al. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1610-7.
 41. Gibson PG, Hargreave FE, Girgis-Gabardo A, Watson RM, Morris M, Denburg JA, Dolovich J. Chronic cough with eosinophilic bronchitis and examination for variable airflow obstruction and response to corticosteroid. *Clin Exp Allergy* 1995;25:127-32.
 42. Brightling CE, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis – What is it and why is it important? *Clin Exp Allergy* 2000;30:4-6.
 43. Brightling CE, Ward R, Wardlaw AJ, Pavord ID. Airway inflammation, airway responsiveness and cough before and after inhaled budesonide in patients with eosinophilic bronchitis. *Eur Respir J* 2000;15:682-6.
 44. Pizzichini MMM. Do we have evidence that sputum eosinophilia is a good or poor predictor of benefit from inhaled corticosteroid therapy in asthma? [Editorial] *Eur Respir J* 2002;20:1359-61.