

CARMEN LÍVIA FARIA DA SILVA MARTINS

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CORTICÓIDE INALATÓRIO
NA ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS E FUNÇÃO FAGOCITÁRIA
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ASMA**

Tese de Doutorado

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Brasília
2013**

CARMEN LÍVIA FARIA DA SILVA MARTINS

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CORTICÓIDE INALATÓRIO
NA ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS E FUNÇÃO FAGOCITÁRIA
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ASMA

Tese apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Patologia Molecular da
Faculdade de Medicina da Universidade
de Brasília como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Universidade de Brasília

Brasília-DF
2013

(...) “O homem deve pesquisar novas verdades e dissecar mesmo aquelas tradicionalmente aceitas, para descobrir novas aplicações delas ou, quando não, para exercitar a sua inteligência, com a liberdade de raciocinar por si mesmo, que é o grande dom do Espírito” (...)

Descartes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido marido e companheiro Ricardo, a minha zelosa mãe e aos meus amados filhos Carolina e Bruno, por acreditarem que eu seria capaz e estarem sempre ao meu lado em todos os momentos dessa longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Tantas são as pessoas, entre colegas, familiares e amigos que preciso agradecer, que mesmo que eu tivesse a intenção de aqui citar todos, correria o risco de omitir alguém. Por isto, peço desculpas antecipadas, caso eu incorra em alguma injustiça.

Gostaria de iniciar agradecendo a minha orientadora, Professora Dra Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira, uma verdadeira mulher guerreira, de fibra, que não fraqueja, e que por isto, nos faz sentir mais forte ante as dificuldades. Sem ela, nada deste trabalho seria possível acontecer.

Ao meu querido marido que nunca desanimou mesmo nos momentos que eu achava que não conseguiria.

Ao meu querido filho pelo apoio tecnológico, e que esteve sempre atento as novidades de literatura que apareciam acerca do tema que eu estava estudando.

A minha querida filha que muito me ajudou com as idéias criativas para as tabelas, as correções em inglês e tantos outros detalhes essenciais para um melhor trabalho.

A Rose que sempre terá o meu afeto, e me ajudou a organizar os arquivos de meus bancos de dados em um momento que eu muito necessitava.

Agradecer imensamente a todos os professores componentes da Banca examinadora, que em tão curto período de tempo, aceitaram o desafio de participarem da minha Defesa de Tese.

À Professora Dra Jussara Fiterman que muito gentilmente aceitou fazer parte da minha banca, embora, por motivos alheios a sua vontade não pode concretizar a sua presença, mas que muito me honrou com o aceite.

À Dra Verônica Moreira Amado que de forma decidida e elegante me deu a honra de sua participação, e muito contribuiu com excelentes observações acerca do meu trabalho, e que tenho certeza muito contribuíram para a minha reflexão.

Ao Professor Dr Márcio Nakanishi que de forma entusiasta me motivou a pensar e repensar os vários caminhos delineados no meu estudo sob uma nova perspectiva.

Ao Professor Dr Carlos Alberto de Assis Viegas que prontamente estava presente neste momento tão importante da minha vida, e muito enriqueceu e contribuiu com suas observações, dando-me oportunidade de retificar conceitos que tornaram meu trabalho mais robusto.

Ao Professor Dr Riccardo Pratesi que sei que empreendeu enorme dedicação pessoal para participar da minha defesa, mas que tanto contribuiu para que eu fizesse as devidas correções tornando o desenho final do meu trabalho mais harmonioso.

A Shirley Claudino Couto, técnica do Laboratório de imunologia Celular, pelo apoio, paciência e dedicação durante todo o tempo de realização dos meus experimentos.

Aos queridos colegas e amigos do Hospital Regional de Ceilândia, Hospital da Criança, Hospital Universitário de Brasília, e Secretaria de Saúde do DF, que demonstraram compreensão e contribuíram cada um como pode no contexto de vida que eu estava passando.

Ao Prof Dr Roberto Bittencourt cuja confiança e apoio a mim dedicados permitiu que eu continuasse a minha jornada de conclusão do trabalho.

A Silvia Almeida Costa, minha auxiliar, que enfrentou enormes dificuldades no período de coleta de material, mas não me abandonou em nenhum momento.

Aos funcionários do laboratório de análises clínicas do HUB pela participação sempre presente durante a fase de coleta de meu estudo.

Aos alunos da graduação de medicina e muitos outros da enfermagem da UnB que participaram ou ainda participam do projeto de extensão em asma, e que contribuíram significativamente não só para a minha pesquisa, como também para a sobrevivência do Projeto e a criação de uma Coorte de pacientes. Peço desculpas se não citar todos: João Victor, Ilka, Bruna, Bárbara, Carina, Ana, Rodrigo Lobo, Gabriel Pontes, Victor, Emanuel, Yanara, Elvis. Muitos deles hoje são colegas de profissão. Obrigada e sucesso a todos vocês!

A Mercedes meu braço direito e esquerdo nas tarefas e organização de minha casa, que entendeu a minha pouca participação nos afazeres domésticos.

Por fim, agradeço de coração a todos os pacientes e seus familiares pela confiança no meu trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	xvii
ABSTRACT	xx
3. INTRODUÇÃO.....	1
3.1. Definição.....	2
3.2. Epidemiologia.....	2
3.3. Fisiopatologia.....	3
3.4. História natural.....	6
3.5. Diagnóstico.....	6
3.6. Classificação da gravidade da asma.....	7
3.7. Classificação baseada no controle da doença.....	8
3.8. O papel da infecção na asma.....	8
3.9. Tratamento.....	9
3.10. Marcadores inflamatórios.....	12
3.11. Justificativa.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
5. INDIVÍDUOS, MATERIAS E MÉTODOS.....	17

5.1. DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS.....	18
5.2. ASPECTOS ÉTICOS.....	19
5.3. TIPO DE ESTUDO, GRUPOS ESTUDADOS E CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS.....	20
5.4. TESTE DE FAGOCITOSE.....	24
5.4.a.Capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.....	24
5.4.b.Preparação da suspensão estoque de leveduras para a realização do teste de fagocitose.....	26
5.4.c.Capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos pelos receptores para opsoninas.....	27
5.5. PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO PELOS FAGÓCITOS PELO TESTE DE NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT).....	28
5.6. ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS AVALIADOS POR PARÂMETROS MORFOLÓGICOS.....	29
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1. Caracterização dos indivíduos.....	32
6.2. Estado de ativação dos eosinófilos.....	38
6.2.1. Eosinófilos normais.....	38
6.2.2. Eosinófilos Espreados.....	39
6.2.3. Eosinófilos emitindo grânulos em pequena, média ou grande quantidade.....	41

6.2.4. Eosinófilos apresentando vacúolos.....	44
6.2.5. Eosinófilos emitindo pseudópodes localizados ou generalizados.....	45
6.2.6. Eosinófilos com contato entre células.....	47
6.2.7. Eosinófilos com degeneração celular.....	48
6.3. FUNÇÃO FAGOCITÁRIA PELOS RECEPTORES QUE RECONHECEM PADRÕES MOLECULARES DE PATÓGENOS.....	57
6.3.1. Função fagocitária em neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos na presença de soro fetal bovino inativado.....	57
6.3.2. Função fagocitária em monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos na presença de soro fetal bovino inativado.....	63
6.4. FUNÇÃO FAGOCITÁRIA PELOS RECEPTORES PARA OPSONINAS.....	71
6.4.1. Função fagocitária em neutrófilos pelos receptores para opsoninas na presença de soro fresco do doador.....	71
6.4.2. Função fagocitária em monócitos pelos receptores para opsoninas presença de soro fresco do doador.....	77
6.5. PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO DE OXIGÊNIO PELOS FAGÓCITOS.....	82
7. DISCUSSÃO.....	84
8. CONCLUSÕES.....	101
9. REFERENCIAS.....	105
10. ANEXOS.....	123

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Caracterização demográfica e tipo de corticóide inalatório.....	33
TABELA 2 - Características clínicas, laboratoriais e funcionais.....	34
TABELA 3 - Estado de ativação dos eosinófilos na asma persistente leve.....	53
TABELA 4 - Estado de ativação dos eosinófilos na asma persistente moderada.....	54
TABELA 5 - Estado de ativação dos eosinófilos na asma persistente grave.....	55
TABELA 6 - Resumo das alterações morfológicas de ativação dos eosinófilos.....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Delineamento experimental.....	19
FIGURA 2 - Teste de Controle de Asma.....	35
FIGURA 3 - Pico de fluxo expiratório.....	36
FIGURA 4 - Porcentagem de eosinófilos no sangue periférico.....	37
FIGURA 5 - Porcentagem de eosinófilos normais à análise morfológica.....	39
FIGURA 6 - Eosinófilos espalhados à análise morfológica.....	41
FIGURA 7 - Eosinófilos emitindo grânulos pequena quantidade.....	42
FIGURA 8 - Eosinófilos emitindo grânulos moderada quantidade.....	43
FIGURA 9 - Eosinófilos emitindo grânulos grande quantidade.....	44
FIGURA 10 - Eosinófilos com vacúolos.....	45
FIGURA 11 - Eosinófilos emitindo pseudópodes localizados.....	46
FIGURA 12 - Eosinófilos com contato entre células.....	47
FIGURA 13 - Eosinófilos com degeneração celular.....	48
FIGURA 14 - Eosinófilos ativados em crianças com asma intermitente.....	49
FIGURA 15 - Eosinófilos ativados em crianças com asma persistente leve.....	50
FIGURA 16 - Eosinófilos ativados em crianças com asma persistente moderada.....	51
FIGURA 17 - Eosinófilos ativados em crianças com asma persistente grave.....	52
FIGURA 18 - Fagocitose em neutrófilos, in vitro, para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ($6,25 \times 10^4$) soro bovino inativado.....	60

FIGURA 19 - Fagocitose em neutrófilos, in vitro, para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ($2,5 \times 10^5$) soro bovino inativado.....	63
FIGURA 20 - Fagocitose em monócitos, in vitro, para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ($6,25 \times 10^4$) soro bovino inativado.....	67
FIGURA 21 - Fagocitose em monócitos, in vitro, para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ($2,5 \times 10^5$) soro bovino inativado.....	70
FIGURA 22 - Fagocitose em neutrófilos, in vitro, para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ($6,25 \times 10^4$) soro fresco do doador.....	73
FIGURA 23 - Fagocitose em neutrófilos, in vitro, para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ($2,5 \times 10^5$) soro fresco do doador.....	76
FIGURA 24 - Fagocitose em monócitos, in vitro, para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ($6,25 \times 10^4$) soro fresco do doador.....	79
FIGURA 25 - Fagocitose em monócitos, in vitro, para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ($2,5 \times 10^5$) soro fresco do doador.....	81
FIGURA 26 - Produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos (NBT).....	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACT - *Asthma Control Test* (Teste de controle de asma)

GINA - *Global Initiative for Asthma*.

AI - Asma intermitente

APL- Asma persistente leve

APM - Asma persistente moderada

APG - Asma persistente grave

CI - Corticóide inalatório

LABA- broncodilatador de longa duração

PEF - Pico de fluxo expiratório

IF- Índice fagocitário

CTR - Crianças controles normais

NBT- *Nitroblue* Tetrazolium

ESP - Espriamento

GP - Grânulos em pequena quantidade

GM - Grânulos em Moderada quantidade

GG - Grânulos em grande quantidade

Pseud Local - Pseudópodes localizados

CC - Contato entre células

DC - degeneração celular

Vac - Vacuólos

STF - Solução Salina Tamponada com Fosfato

IMC - Índice de massa corporal

RESUMO

Introdução e justificativa: A asma é doença inflamatória crônica e o corticóide padrão ouro de tratamento, entretanto, o efeito dele na imunidade inata carece esclarecimento, urge marcadores inflamatórios não invasivos na pediatria para avaliar e acompanhar o tratamento. O objetivo do trabalho foi avaliar influência do tratamento com corticóide inalatório (CI) por seis meses na ativação dos eosinófilos e na função fagocitária de neutrófilos e monócitos do sangue periférico em crianças e adolescentes com asma.

Metodologia: Sangue venoso periférico foi coletado de 149 crianças e adolescentes asmáticos e 26 crianças controle normais. A ativação dos eosinófilos foi avaliada pelas alterações morfológicas (emissão de pseudópodes generalizados ou localizados, emissão de grânulos em pequena, moderada ou grande quantidade, espraiamento, presença de vacúolos citoplasmáticos, eosinófilos em degeneração, contato entre células) após aderência em lâmina, e a fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como a produção de ânions superóxido por monócitos e neutrófilos, antes do tratamento com CI, aos 3 e 6 meses. O teste de Mann-Whitney comparou crianças asmáticas antes do tratamento e controles normais e o teste de Kruskal-Wallis/Dunn a influência do CI antes, aos 3 e 6 meses.

Resultados: Houve uma maior porcentagem de eosinófilos ativados nas crianças asmáticas que no controle, antes do tratamento, e dentre as alterações morfológicas, espraiamento em crianças APL ($P=0,003$), grânulos pequena quantidade em APM ($P=0,0003$), grânulos moderada quantidade em APL ($P=0,0001$), pseudópodes localizados em APM ($P=0,0062$), contato entre células em APL ($P=0,028$), degeneração celular em APL ($P=0,007$). Seis meses de tratamento diminuíram espraiamento em crianças APL ($P=0,0009$), grânulos em pequena quantidade em APM ($P=0,0006$), grânulos em moderada quantidade em APL ($P<0,0001$), grânulos em grande quantidade em APG ($P=0,038$), pseudópodes localizados em APL ($P=0,0033$), contato entre células em APG ($P=0,0033$) e degeneração celular em APM ($P=0,04$).

A fagocitose dos monócitos e neutrófilos via receptores ou por opsoninas em crianças asmáticas, antes do tratamento, foi menor que nos controles ($P < 0.05$) sem influencia da gravidade da asma. CI por 6 meses não normalizou fagocitose dos neutrófilos e monócitos, embora melhore clinicamente. Produção de ânions superóxido foi menor em crianças asmáticas antes do tratamento e o CI normalizou a produção em crianças com APL quando avaliado sem estímulo, havendo diminuição da produção quando estimulado ($p < 0,05$).

Conclusões: A imunodeficiência dos fagócitos permaneceu mesmo após seis meses de tratamento com CI. Entretanto, houve melhora na ativação dos eosinófilos em crianças com APL e APM. Assim, analisar quantitativamente alterações morfológicas nos eosinófilos é fácil e possível, e pode objetivar a avaliação da inflamação durante o tratamento com CI.

ABSTRACT

Introduction and aim: Asthma is a chronic inflammatory disease and corticosteroids are the first-line therapy for the disease. However, the effect of corticosteroids on the innate immune system remains unclear. Furthermore, there aren't non-invasive reliable markers of inflammation to follow-up the treatment. The aim of this work was to evaluate the influence of inhaled corticosteroid therapy (ICT) for 6 months on the activation of eosinophils and phagocyte functions in asthmatic children.

Methods: Peripheral venous blood was collected from 149 children with asthma and 26 healthy control children. The percentage of eosinophils with morphological changes (emission of single or multiple pseudopods, releasing a small, moderate, or large quantity of granules, spreading, presence of cytoplasmic vacuoles, eosinophil death, and contact between cells) was quantified after the adherence to a slide before, after 3 and 6 months ICT. The phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by blood monocytes and neutrophils and the production of superoxide anions were assessed before and after three and six months of ICT. The Mann-Whitney was used to compare asthmatic children before and after treatment and the Kruskal-Wallis/Dunn was used to analyze the influence of ICT throughout the treatment .

Results: The percentage of activated eosinophils was higher in asthmatic children than in healthy control. The more significant increase before treatment were spreading in children with mPA (P=0,003); releasing a small quantity of granules in mPA (P=0,0001); releasing moderate quantity of granules in mPA (P=0,0001); emission of single pseudopods in MPA (P=0,0062); eosinophils in contact between cells in mPA (P=0.028); and eosinophil death MPA (P=0,007). After 6 months treatment there was a decrease in the following morphological changes: spreading in children with mPA (P=0,0009); releasing a small quantity of granules in MPA (P=0,0006); releasing moderate quantity of granules in mPA (P<0.0001); releasing a large quantity of granules in SPA (P=0,038); emission of single pseudopods in mPA (P=0,0033); eosinophils in contact between cells in SPA (P=0,0033) and eosinophil death in MPA (P=0,04).

The phagocytosis via opsonines receptors was lower in asthmatic children before treatment and was independent from asthma severity. ICT treatment for 6 months was insufficient to normalize phagocytosis function. Superoxide anion production

was also decreased in the asthmatic children before treatment, and ICT normalized the O_2^- production only for children with mild persistent asthma when assessed at baseline but caused this function to decrease after stimulation.

Conclusion: The phagocyte immunodeficiency remained lower after 6 months of treatment. However, there was an improvement in several morphological changes in eosinophils characteristic of activation in children with mPA and MPA. Quantifying the morphological changes in eosinophils is feasible, easy and reliable and therefore might to be used as an objective mark to follow up inflammation during ICT.

3. INTRODUÇÃO

3.1. DEFINIÇÃO

A asma é conceituada pelas principais diretrizes da seguinte forma: “Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células e elementos celulares têm participação. A inflamação crônica está associada à hiperreatividade das vias aéreas, que leva a episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, opressão torácica e tosse, particularmente à noite ou no início da manhã. Esses episódios são uma consequência da obstrução ao fluxo aéreo intrapulmonar generalizado e variável, reversível espontaneamente ou com tratamento.” (GINA, 2010; Diretrizes SBPT, 2012). Tal definição é uma mostra clara da complexidade da asma, a ponto de muitos defenderem que ela seja o fenótipo de muitas doenças (Wenzel, 2006; Borrich, 2008). Trata-se de uma doença heterogênea com imenso espectro de sinais e sintomas que variam de indivíduo para indivíduo e os fatores genéticos e ambientais parecem ter uma influência na expressão e progressão da doença (Martinez, 2003).

3.2. EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO

Estudar asma é, portanto um desafio instigante. Desafio que se inicia por ser a asma uma das doenças crônicas mais comuns na infância, sendo que, na maioria dos casos, os sintomas aparecem nos primeiros anos de vida (GINA, 2010). Apresenta grande prevalência no mundo, com indícios de que esteja aumentando a cada ano. No Brasil estima-se que haja 20 milhões de pacientes asmáticos (Solé, 2006; Solé, 2007). No entanto, apesar da taxa de internação apresentar declínio desde o ano 2000, houve registro de 160 mil hospitalizações

em 2011, constituindo a asma na quarta causa de internação do Sistema Único de Saúde (Ministério da Saúde, 2012). Asma é uma enfermidade que não afeta somente o paciente, mas também seus familiares, bem como a sociedade, ao ocasionar idas frequentes aos serviços de pronto socorro, com eventuais internações, absenteísmo escolar e no trabalho e prejuízo na qualidade de vida (Busse et al, 2007).

3.3 FISIOPATOLOGIA

A inflamação da asma é predominantemente eosinofílica e cursa com hiperresponsividade brônquica. Alguns estudos têm demonstrado que a gravidade da doença está associada ao número de eosinófilos no pulmão, e que isto poderia auxiliar na terapêutica da asma grave (Hogan, 2007, Fahy, 2009, Haldar et al, 2009). Porém, a resposta inflamatória na asma, além do envolvimento dos eosinófilos, atinge também a ativação dos linfócitos T e de células mastocitárias, o que promove alterações estruturais da parede brônquica (GINA, 2010; Laitnen et al., 1985). No entanto, a inflamação da asma tem sido descrita não somente como eosinofílica, mas também como neutrofílica (Stevenson et al., 1997). Choi et al. (2012) demonstrou que indivíduos com asma refratária que tinham obstrução persistente das vias aéreas apresentavam padrão inflamatório neutrofílico em comparação com o padrão eosinofílico observado naqueles que não tinham obstrução persistente das vias aéreas. Foi demonstrado que na asma grave resistente ao tratamento há variabilidade no número de eosinófilos associada com aumento do número de neutrófilos (Bossley et al, 2012).

Pacientes com asma refratária ao tratamento apresentam desregulação na expressão de alguns genes que codificam citocinas Th2/Th1 nas células do aparelho respiratório (Leung et al., 1995). A inflamação na asma se desenvolve por uma interação das células inflamatórias com as células residentes no pulmão, culminando na inflamação crônica característica da doença (Dunnill et al., 1969; Fireman, 2003).

A ativação das células residentes no pulmão liberariam mediadores pró-inflamatórios tais como, ânions superóxido e óxido nítrico (Henricks & Nijkamp, 2001, Palmer et al., 1987; Andreadis et al., 2003), que na presença de inflamação ou estímulo imunológico são sintetizados pelos macrófagos e células epiteliais do trato respiratório, por meio da enzima cálcio-independente óxido nítrico sintase, encontrada em células epiteliais de pacientes asmáticos e não em vias aéreas normais (Hamid et al., 1993), provavelmente, pela exposição das células as citocinas durante a inflamação no paciente asmático (Khanduja et al., 2011).

As endotoxinas por sua vez ativam células mononucleares e linfócitos do sangue periférico (Meerschaert et al., 2000; Sabroe et al., 2003; Liu et al., 2008) e induzem inflamação sistêmica e das vias aéreas (Nightingale et al., 1998; Michel et al., 2001). Elas têm papel relevante na asma, podendo prevenir a atopia quando ocorrer exposição nos primeiros anos de vida (Braun et al., 2002), entretanto podem piorar o controle da asma no adulto (Michel et al., 2001).

Das diferentes células que participam do processo inflamatório, os eosinófilos têm sido muito estudados. A presença de grânulos citoplasmáticos é uma das principais características morfológicas dos eosinófilos (Gleich et al., 1992). Essas células liberam uma série de proteínas durante a exacerbação de um quadro de asma. Entre elas, a proteína básica principal provoca dano ao epitélio das vias

aéreas, com conseqüente aumento da reatividade brônquica, que vai resultar em broncoespasmo e agravamento do processo inflamatório com a ativação de mastócitos. No entanto, mesmo ativados eles mantêm as mesmas características de um polimorfonuclear, porém, dentre outros aspectos, apresentam um maior número de corpos lipídicos citoplasmáticos e vesículas (Dvorak et al., 1994). O leucotrieno C4, substância produzida pelos eosinófilos, é também capaz de desencadear broncoespasmo, além de promover o aumento da permeabilidade vascular e de recrutar eosinófilos para as vias aéreas (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006; Bousquet, 1990; ISAAC, 1998; Martinez, 2003; Pizzichini & Pizzichini, 1996).

Alguns mecanismos são importantes para a defesa do pulmão, dentre eles, a limpeza ou eliminação de bactérias e partículas inaladas e a fagocitose destas partículas ou outros microrganismos pelos macrófagos pulmonares (Donnelly, 2012). Tem sido demonstrado que os indivíduos com asma leve têm diminuição da fagocitose quando comparado aos indivíduos saudáveis (Alexis, 2001). O papel dos macrófagos alveolares é importante tanto na fagocitose de partículas como mediadores de processos que envolvem outros tipos de células (Stenson, 1980).

A conseqüência mais temida da atividade inflamatória na asma é a proliferação de células com depósito intersticial de colágeno na membrana basal, acarretando lesões irreversíveis que vão se constituir no remodelamento da estrutura bronquial e resultar em irreversibilidade da obstrução das vias aéreas comprometidas (Bousquet, 2000; Kumar, 2001).

3.4. HISTÓRIA NATURAL

A história natural da doença indica que a asma se torna persistente devido à interação da resposta imune com os alérgenos, bem como, com os vírus que acometem o aparelho respiratório (Martinez, 1995, Martinez, 2003). A infecção pelo rinovírus em idade precoce da vida se constitui em um significativo preditor para o decréscimo da função pulmonar até aos oito anos de idade (Guilbert et al., 2011). As infecções pelo rinovírus na infância estariam associadas à bronquiolite e ao desenvolvimento de asma no adulto, bem como com as exacerbações pela doença (Rawlinson et al, 2003; Jartti et al, 2004, Gern et al, 2008; Jartti et al, 2011).

3.5. DIAGNÓSTICO

Asma é uma doença que se caracteriza por ser a expressão de uma inflamação das vias aéreas com consequente obstrução das pequenas vias, que resultam em chiado no peito, tosse, limitação às atividades físicas e falta de ar.

O diagnóstico é principalmente clínico e traduzido por sintomas de tosse, dispnéia, sibilância, opressão torácica, especialmente nas primeiras horas da manhã e à noite. Os sintomas podem piorar, desencadeando crises quando em contato com aeroalérgenos ou irritantes, dentre eles ácaros, e exercício físico, e melhorar espontaneamente ou pelo uso de medicações específicas para asma. O exame físico pode ser inespecífico, especialmente na intercrise. Os testes diagnósticos incluem: espirometria pré e pós broncodilatador, testes de broncoprovocação e medidas seriadas de PEF (GINA 2010).

3.6.CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA ASMA

De acordo com a gravidade, a doença é classificada como intermitente ou persistente na consulta inicial, baseados na frequência e intensidade de sinais e sintomas, necessidade de uso de medicação de resgate e as alterações da função pulmonar (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006).

Indivíduos com asma intermitente apresentam sintomas diurnos e fazem uso de broncodilatador de resgate na frequência de ≤ 1 vez por semana, e despertares noturnos ≤ 2 vezes por mês, não há limitação às atividades físicas, a função pulmonar está preservada, as exacerbações são ocasionais e leves sem necessidade de ida ao pronto socorro. Enquanto aqueles com asma persistente apresentam os sintomas diurnos numa frequência de semanal à diária ou contínua, têm despertares noturnos na frequência de mensais à quase diários, apresenta limitação das atividades físicas durante os períodos de exacerbação e até mesmo de forma contínua nos períodos intercrises, exacerbações frequentes e que afetam as atividades e o sono, necessitando frequentemente de lançar mão de broncodilatador de curta duração no resgate da crise, e uma deterioração gradativa da função pulmonar, caracterizando um distúrbio obstrutivo (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006; GINA, 2010).

A asma persistente por sua vez é classificada em leve, moderada e grave. Nesse caso, observa-se um aumento da frequência e intensidade dos sintomas, que passam a exigir o uso mais freqüente da medicação de alívio e a um maior comprometimento da função pulmonar. Indivíduos com crises infrequentes, mas que tenham tido sua vida em risco, são classificados como portadores de asma

persistente grave (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006; GINA, 2010).

3.7.CLASSIFICAÇÃO BASEADA NO CONTROLE DA ASMA

A obtenção do controle da asma é o principal objetivo no manejo da doença por meio do controle das limitações clínicas atuais e a redução dos riscos futuros advindos do tratamento, como por exemplo, os efeitos adversos do uso prolongado de corticóide. Os mesmos parâmetros utilizados para a classificação inicial da gravidade da doença são também utilizados para avaliação da eficácia da terapêutica e o estado de controle da asma. Tal controle deve ser avaliado a cada consulta referindo-se de preferência as quatro últimas semanas. Desta forma, a asma pode ser categorizada em asma controlada, asma parcialmente controlada e asma não controlada. (Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2012; GINA, 2010).

3.8.O PAPEL DA INFECÇÃO NA ASMA

Apesar do papel da infecção bacteriana na asma ainda não estar suficientemente claro, há evidências que as infecções bacterianas podem contribuir para a fisiopatologia de várias doenças pulmonares, inclusive a asma (Donnelly, 2012). E que a infecção pela *Chlamydia pneumoniae* e pelo *Mycoplasma pneumoniae* estão associados com as exacerbações e a severidade da asma (Singh et al., 2006). Além disso, as crianças com asma grave não

controlada apresentaram uma resposta fagocitária diminuída contra *S. aureus* (Fitzpatrick, 2008) e os monócitos do paciente asmático apresentam imunossupressão em relação à *Candida albicans* (Heindenreich et al., 1994). Outros estudos, usando lipopolissacarídeos inalados demonstraram redução da expressão de CD11b e da fagocitose em fagócitos do escarro e do sangue periférico em pacientes com asma leve (Alexis et al., 2003). Por fim, tem sido sugerido que um defeito do sistema imune em destruir os patógenos resultaria na colonização bacteriana das vias aéreas, e supressão das funções fagocitárias, resultando em destruição do tecido pulmonar e perpetuação do processo inflamatório (Donnelly et al., 2012)

Alguns estudos sugerem que a falta de controle da asma estaria ligada a infecção crônica, e que esta por sua vez afetaria o sistema imunitário (Black et al., 2000; Johnston et al., 2005). Como também, a produção de radicais livres superóxido pelos macrófagos alveolares, eosinófilos e leucócitos polimorfonucleares de pacientes com asma (Cluzel, et al., 1987; Vachier, et al., 1992; Chanez et al., 1990; Calhoun et al, 1992) contribuiriam para a patogênese da doença (Khanduja, et al., 2011). Além disto, o stress oxidativo surge como um mecanismo comum que pode alterar as funções dos macrófagos e dos neutrófilos (Donnelly, 2012), que contribuiria para a patogênese da doença (Khanduja, et al., 2011).

3.9. TRATAMENTO

O objetivo principal do tratamento da doença é manter o paciente assintomático pelo maior tempo possível, com prevenção das exacerbações da doença, a manutenção da função pulmonar mais próxima do normal, e o controle

da inflamação. Assim a ação prioritária é manter o controle da asma (GINA, 2011).

Os corticosteróides se constituem na mais potente terapia antiinflamatória usada para o tratamento da asma, entretanto, os mecanismos pelos quais os corticóides reduzem a inflamação na asma são ainda pouco compreendidos (Leung et al., 1994). Eles diminuem o número e a ativação das células inflamatórias nas vias aéreas, incluindo células mastocitárias, células dendríticas, eosinófilos e linfócitos T. Modulam a produção de várias citocinas, quimiocinas, ácido aracdônico e moléculas de adesão. Eles diminuem, dentre outras, a produção de IL-3, IL-4 e IL-5 e aumentam a produção do IFN- γ e da IL-12. Modulam também a quimiotaxia e a capacidade de aderência dos eosinófilos (Schliemer,1990; Robinson et al., 1992, Robinson et al., 1993). No entanto, a liberação de IgE dependente de células mastocitárias não sofrem ação do corticóide, e sua ação sobre as funções dos eosinófilos parece ocorrer de forma indireta, por meio das citocinas do linfócitos T, células endoteliais e células epiteliais (Lopez et al.,1986; Owen et al.,1989; Rothenberg et al., 1988; Clutter-Buck et al., 1989; Nakamura at al., 1996).

A intervenção precoce com corticóide inalatório (CI) na asma revolucionou o manejo da doença, com marcada diminuição na morbidade e mortalidade (Barnes, 2011), no entanto, apesar da efetividade do tratamento da asma com CI, um grupo de pacientes não atinge o controle da doença, mesmo com doses altas do CI e por tempo prolongado, sendo necessário encontrar respostas estudando os meandros da resposta inflamatória (Carmichael et al., 1981). No entanto, a

variabilidade de mecanismos moleculares pode contribuir para a resistência ao corticóide no paciente com asma (Sher et al., 1994).

Há dois grupos de medicamentos no acompanhamento do paciente com asma: os medicamentos de manutenção e os de resgate da exacerbação. Os primeiros são representados pelos corticóides inalatórios e usados como medicação única ou associados ao β -₂ agonista de longa duração, diariamente. Para o tratamento das exacerbações da doença são usados fármacos do grupo dos β -₂ agonista de curta duração (GINA, 2012).

O tratamento farmacológico da asma depende da classificação da gravidade da doença estabelecida na primeira avaliação do paciente (GINA, 2010). Entender os diferentes fenótipos da asma pode auxiliar na escolha do tratamento que conduzirá à melhor resposta (Holgate, 2008).

Entretanto, a influência do CI sobre a função fagocitária em indivíduos com asma é ainda pouco esclarecida. Os mecanismos moleculares de recrutamento e ativação das células inflamatórias são ainda pouco compreendidos, principalmente nos primeiros anos de vida (Snijders, 2010). Foi demonstrado que a dexametasona aumenta a capacidade fagocitária de monócitos humanos (van der Goes et al., 2000). A hidrocortisona, apesar de diminuir a afinidade dos receptores para os glicocorticóides, tem a mesma capacidade de aumentar a atividade fagocitária dos monócitos que a dexametasona (Werb et al., 1978).

Tem sido definido que o manejo da doença deve ser personalizado por meio de estratégias de intervenção precoce. E, em geral, são necessários seis meses de monitoramento medicamentoso para a obtenção do controle da doença (Gibeon, 2012). Entender os diferentes fenótipos da asma poderá auxiliar na escolha do tratamento que conduzirá a melhor resposta (Holgate, 2008), em

especial, nas crianças com asma de difícil controle, por se constituírem em um grupo heterogêneo, e os pacientes que não atingem o controle da doença com a terapia convencional necessitam de melhor investigação (Fleming et al., 2007, Fleming et al., 2012; Nair et al., 2009).

O manejo do paciente com asma grave seria mais bem conduzido por uma equipe multidisciplinar, em busca da classificação da doença e instituição da melhor terapêutica de forma personalizada (Gibeon et al., 2012, Portelli et al., 2012; Szefer, 2012), de modo a melhorar a qualidade de vida destes indivíduos (Donnelly, 2012). Tanto a morbidade quanto a mortalidade por asma estão associados às exacerbações pela doença, que por sua vez se associam a inflamação eosinofílica. Assim a prevenção das crises é um dos objetivos da terapia (GINA, 2010; GINA, 2012).

3.10.MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Embora muito estudado, não existe, até o momento, um marcador laboratorial que estabeleça diagnóstico e prognóstico da doença, como também da resposta à terapêutica. Assim sendo, torna-se fundamental o melhor esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença e esclarecimento das respostas do indivíduo ao tratamento, com vistas a identificar marcadores que poderiam ser utilizados no acompanhamento dos pacientes.

Vários trabalhos têm sido feitos com o objetivo de procurar marcadores fidedignos. Snijders et al. (2010) estudaram 191 crianças, sendo 91 com asma, 44 atópicos sem asma e 56 não atópicos e não asmáticos controles, por meio da avaliação dos marcadores eosinofílicos e neutrofílicos no lavado broncoalveolar.

Os autores concluíram que os marcadores eosinofílicos (número de eosinófilos e proteína catiônica eosinofílica) encontravam-se aumentados nas crianças com asma com ou sem atopia, mas não os marcadores neutrofílicos.

Norzila et al. (2000) ao estudar estes marcadores eosinofílicos e neutrofílicos concluíram que ambos podem estar aumentados na crise de asma aguda e que esta heterogeneidade de inflamação pode interferir na resposta terapêutica aos corticosteróides.

Nos últimos anos tem aumentado o interesse por marcadores inflamatórios não invasivos para monitoramento da inflamação das vias aéreas pela asma, entre eles a avaliação dos eosinófilos no escarro induzido. (Bakakos et al., 2011; Pavord et al., 1997; Gibson et al., 2000). A contagem dos eosinófilos, a proteína catiônica eosinofílica, tanto no sangue periférico como no escarro induzido e no lavado broncoalveolar, e o óxido nítrico exalado têm sido utilizados como preditores da resposta ao tratamento da asma (Bakakos et al., 2011; Pavord et al., 1997; Malerba et al., 2008; Bousquet et al., 1990). Muniz-Junqueira et al. (2013) descreveram que as alterações morfológicas dos eosinófilos em pacientes com asma durante as exacerbações e no período intercrise mostram correlação com a gravidade da doença e que estes parâmetros poderiam ser utilizados como preditores da gravidade da doença.

Há ainda que se responder a importantes questões, dentre elas, como os fatores genéticos predispõem os pacientes a asma, como a defesa contra microorganismos se apresenta no paciente com asma, e como os mecanismos celulares frente a diferentes exposições ambientais interferem na persistência e cronicidade da asma. O monitoramento da inflamação na asma é fundamental para prever o prognóstico da doença e estabelecer uma conduta terapêutica

personalizada. Marcadores inflamatórios não invasivos seriam os instrumentos ideais para a utilização, especialmente, na faixa etária pediátrica.

3.11.JUSTIFICATIVA

Avaliar a influência do tratamento com corticóide inalatório no estado de ativação dos eosinófilos por meio das alterações morfológicas, bem como na função fagocitária de neutrófilos e monócitos do sangue periférico em crianças e adolescentes com asma procurando uma melhor compreensão da resposta ao tratamento, podendo contribuir para a obtenção de parâmetros objetivos de avaliação da resposta à terapêutica em indivíduos asmáticos, foi o que motivou a condução da presente pesquisa.

4.OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

4.1. PRINCIPAL:

Avaliar a influência do tratamento com corticóide inalatório no estado de ativação dos eosinófilos e na função fagocitária em crianças e adolescentes com asma.

4.2. SECUNDÁRIOS:

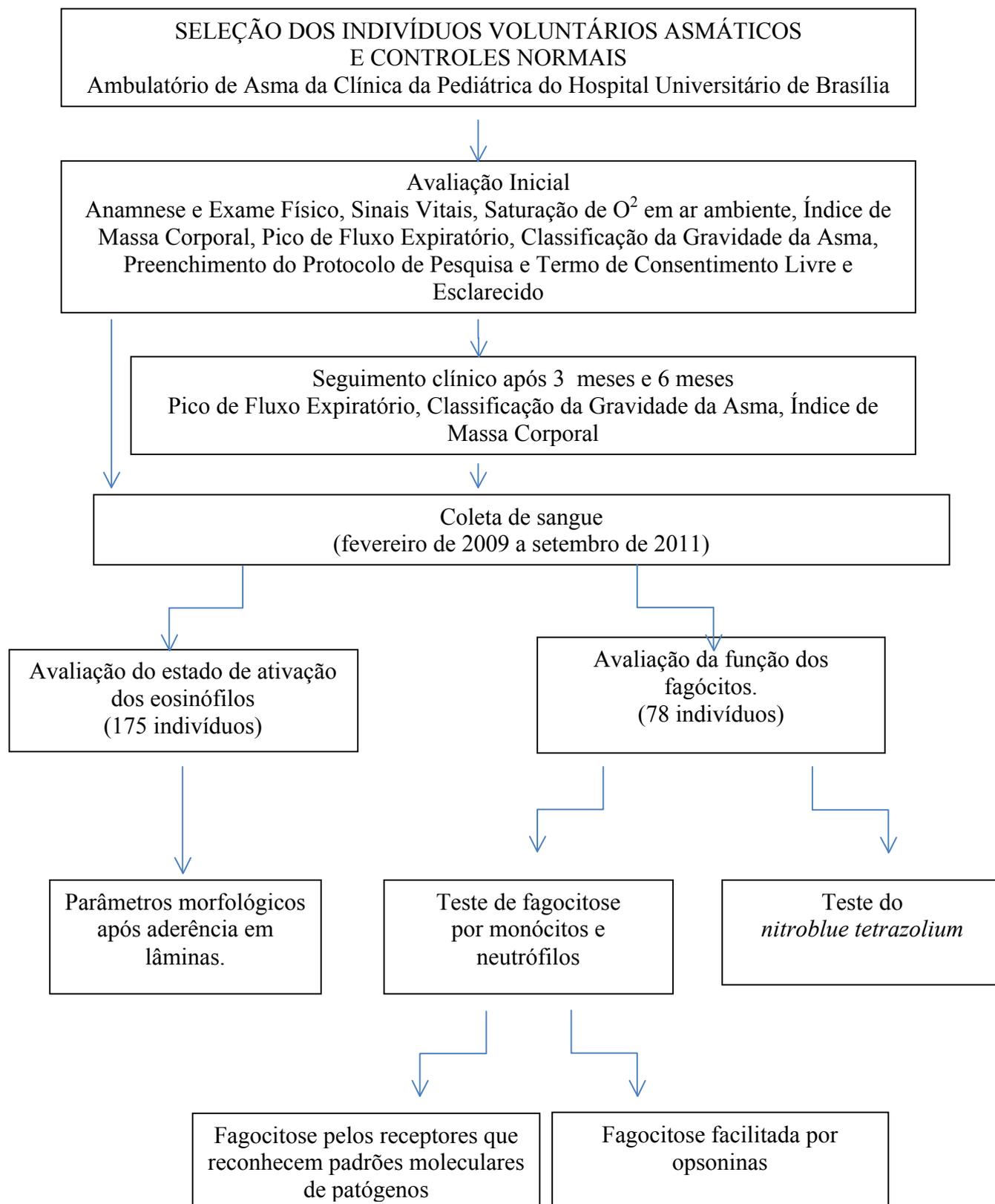
1. Avaliar os parâmetros das funções dos fagócitos em diferentes extratos de gravidade da doença antes do tratamento com corticóide inalatório.
2. Avaliar os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos em diferentes extratos de gravidade da doença antes do tratamento com corticóide inalatório.

5. INDIVÍDUOS, MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS

No presente estudo foram avaliados o estado de ativação dos eosinófilos e a função fagocitária e produção de ânions superóxido pelos fagócitos de crianças com asma e controles normais. A função fagocitária foi avaliada em neutrófilos e monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e pelos receptores para opsoninas. A avaliação da capacidade de produzir radicais de oxigênio pelos fagócitos foi feita pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT). O estado de ativação dos eosinófilos foi analisado por parâmetros morfológicos após aderência das células à lâmina. O delineamento dos experimentos se encontra na Figura 1.

Figura 1 - Delineamento experimental



5.2. ASPECTOS ÉTICOS

As normas éticas para pesquisa científica em seres humanos, estabelecidas pela Declaração de Helsinki atualizada e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, foram rigorosamente observadas durante todo o desenvolvimento do presente trabalho. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (processo número: CEP-FM 002/2007) (ANEXO 1). O projeto encontra-se dentro do grupo de risco mínimo, tendo sido realizada a coleta de 1 a 10 mL de sangue de cada indivíduo por punção venosa periférica, com material estéril e descartável, após o consentimento escrito dos pais ou responsáveis, e de serem informados sobre os objetivos e os procedimentos a serem realizados (TCLE- ANEXO 2).

5.3. TIPO DE ESTUDO, GRUPOS ESTUDADOS E CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Estudo longitudinal prospectivo com amostra de conveniência, sendo os indivíduos selecionados quando procuravam por demanda espontânea o Ambulatório de Asma do Centro de Clínicas Pediátricas do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB), que é um dos Centros de Referência do Programa de Atendimento ao Paciente Asmático do DF (PAPA-DF), no período de fevereiro de 2009 a setembro de 2011.

O grupo de crianças e adolescentes na sua totalidade foi constituído por 175 indivíduos, sendo 149 indivíduos asmáticos, entre 2 anos a 16 anos e dois meses (média \pm DP = 7,48 \pm 3,6 anos), de ambos os sexos, sendo 85 do sexo masculino (57%) e 64 do sexo feminino (42,9%), e 26 indivíduos controle normais entre 4 anos e 8 meses a 17 anos (média \pm DP = 11,11 \pm 3,03 anos), de ambos

os sexos, sendo 12 do sexo masculino (46,1%) e 14 do sexo feminino (53,8%) (Os dados individuais encontram-se na tabela 1).

Na avaliação inicial, os indivíduos definidos como portadores de asma pelos critérios das IV Diretrizes Brasileiras de Manejo da Asma (2006) foram e classificados quanto à gravidade da doença pela história e o exame clínico segundo o protocolo clínico, considerando a frequência de sintomas clínicos e funcionais, e os critérios de inclusão e os de exclusão (Anexo 3 e 4) .

O sangue era coletado para análise dos parâmetros imunológicos antes do tratamento e o tratamento com corticóide inalatório (CI) era iniciado imediatamente. Os seguintes esquemas terapêuticos foram utilizados por via inalatória: corticóide (Beclometasona 250mcg, ou Budesonida 200mcg ou 400mcg, ou Fluticasona 125 mcg 12x12horas), associado ou não a um agonista β^2 de longa duração (formoterol, 6mcg ou 12mcg, ou salmeterol 25mcg) conforme a classificação inicial da doença e idade da criança (tabela 1). Os indivíduos eram então reavaliados após 3 e 6 meses de tratamento com o corticóide. Exceto para os indivíduos classificados como asma intermitente, para os quais foi feita apenas uma coleta de sangue. Para estes indivíduos não é preconizado o uso de CI.

Foram analisados em cada indivíduo: os dados antropométricos, a classificação inicial da gravidade da asma, os sinais vitais (frequência respiratória, frequência cardíaca e saturação de oxigênio); hemograma completo, pico de fluxo expiratório (o medidor de pico de fluxo expiratório que foi utilizado foi o *Healthscan products Inc.* elaborado de matéria plástica, contendo um sistema graduado de medidas que avalia a força e a velocidade da saída de ar na expiração forçada em L/min), parâmetros clínicos evolutivos (grau de controle da

asma) (Tabela 2). Os dados demográficos e antropométricos dos indivíduos do estudo encontram-se na Tabela 1.

Sangue venoso periférico era coletado para avaliação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos, da função fagocitária e para o teste do NBT, que foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. O hemograma foi realizado utilizando o equipamento *Cell-dyn 3700*, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Brasília da Universidade de Brasília. Na avaliação após 3 e 6 meses de tratamento com o corticóide, o grau de controle clínico da doença foi caracterizado pelas Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma(2012) adaptada da GINA (2010) (Anexo 5) e pela aplicação do Teste de Controle da Asma (*Asthma Control Test*) (ACT), adaptado para crianças abaixo de quatro anos de idade, e era respondido pela própria mãe ou responsável, uma vez que o estudo contempla esta faixa etária. (Natan et.al, 2004),

Do grupo de 175 indivíduos estudados, os parâmetros de ativação dos eosinófilos foram analisados em 149 indivíduos com asma e em 26 controles. Das crianças com asma, 26 crianças foram classificadas como asma intermitente, 63 crianças como asma persistente leve, 41 crianças como asma persistente moderada e 19 crianças com asma persistente grave, pelos critérios das IV Diretrizes Brasileiras de Manejo da Asma (2006).(ANEXO 4)

Para avaliação das funções dos fagócitos (neutrófilo e monócito), foram estudadas 21 crianças como controles saudáveis e 58 crianças com asma, que foram classificadas em: 07 crianças com asma intermitente, 24 crianças com asma persistente leve, 20 crianças com asma persistente moderada e 14 crianças

com asma persistente grave, pelos critérios das IV Diretrizes Brasileiras de Manejo da Asma (2006). (ANEXO 4)

Foram considerados critérios de inclusão: crianças acima de dois anos e adolescentes até 18 anos portadores de asma, atendidos no Ambulatório de Asma do Centro de Clínicas Pediátricas do HUB-UnB, originados de demanda interna ou externa; concordância dos pais ou responsáveis em participar da pesquisa, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). E, foram considerados critérios de exclusão: crianças concomitantemente portadoras de neoplasias, diabetes, síndrome de Down ou outras síndromes genéticas, doenças de depósitos ou erros inatos do metabolismo, doenças da tireóide, doença celíaca, fibrose cística, doenças auto-imunes (artrite reumatóide juvenil, lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite, etc), doença renal, cardíaca, hepática, outras doenças pulmonares (intersticiais, displasia broncopulmonar, tuberculose; síndrome da imunodeficiência adquirida, hipo/agamaglobulinemia, doença de Crohn, uso de imunossupressor, ou qualquer alteração que os pesquisadores considerassem que pudesse alterar as funções do sistema imunitário, uso prévio ou concomitante de corticóide inalatório para tratamento de asma nos 6 meses anteriores, encontrados no protocolo de pesquisa.(ANEXO 3)

Para avaliação do grau de controle da doença, foi aplicado o ACT (Natan et., 2004), que fornece uma pontuação que varia de 5-25 pontos, cuja correspondência clínica com a GINA é a seguinte:

Abaixo de 20 pontos (Fora do Alvo - doença não controlada - ASMA NÃO CONTROLADA);

Entre 20 e 24 (No Alvo – a doença pode estar bem controlada - ASMA PARCIALMENTE CONTROLADA);

Igual ou acima de 25 (No Alvo – Controle Total da Doença - ASMA TOTALMENTE CONTROLADA) (Anexo 5).

O grupo controle foi selecionado entre crianças acompanhantes e/ou aquelas que foram atendidas no ambulatório de pediatria do HUB em consulta de rotina que não apresentavam histórico de doenças alérgicas, outras doenças ou uso de medicamentos que interferissem com a função do sistema imunitário, conforme os critérios de exclusão.

5.4. TESTE DE FAGOCITOSE

5.4.a. Influência do tratamento de manutenção com corticóide inalatório sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos de indivíduos com asma pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos

Com o objetivo de avaliar a influência do tratamento com corticóide inalatório sobre a capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos das crianças com asma pelos receptores dos fagócitos que reconhecem padrões moleculares de patógenos, foi realizado o teste de fagocitose em 58 crianças com asma e 21 controles, nos tempos zero, três e seis meses de tratamento.

Foi realizada a coleta de sangue venoso periférico com vacutainer heparinizado estéril, seguido de distribuição de 40 µL de sangue por escavação

de um total de oito escavações de 7 mm de diâmetro, delimitada por epóxi, em lâminas de microscopia. Em seguida as lâminas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 45 minutos, para permitir a aderência dos fagócitos à lâmina. Após este processo as lâminas eram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2 a 37°C, visando a retirada das células não aderentes (eritrócitos, plaquetas e linfócitos). As células aderidas (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) eram incubadas com $6,25 \times 10^4$ ou $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, em preparações em duplicata, suspensos em Hanks-triz (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, em câmara úmida, por 30 min, a 37°C, para permitir a fagocitose. Depois deste tempo, as preparações eram lavadas com STF, pH 7,2, para retirar as leveduras não fagocitadas, sendo a última lavagem realizada com Hanks-triz (Gibco) a 30%, visando a melhor preservação das preparações. Para a secagem das lâminas utilizava-se vento quente, e quando as lâminas estavam secas eram fixadas com metanol absoluto (Vetec) por um minuto e coradas com Giemsa (Dinâmica) a 10% em tampão para coloração, pH 7,2, por 10 minutos. Os fagócitos eram analisados ao microscópio óptico com objetiva de imersão, sendo contados 200 monócitos e 200 neutrófilos por preparação, para determinar o índice fagocitário, sendo as lâminas identificadas apenas ao final das leituras.

Para a determinação do índice fagocitário multiplicava-se a média do número das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ingeridas por fagócito pela proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose, individualizando a análise para os neutrófilos e monócitos em cada preparação. Assim, o Índice Fagocitário =

média de leveduras ingeridas por fagócito x proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose (Muniz-Junqueira et al., 2003).

5.4.b. Preparação da suspensão estoque de leveduras para a realização do teste de fagocitose

Foi utilizada a técnica descrita por Lachman e Hobart (1978) para o preparo de suspensão estoque de leveduras para a realização do teste de fagocitose. Quando as leveduras são tratadas por meio desta técnica há uma modificação em sua superfície, a qual facilita a adsorção do componente C3 do complemento. Foi demonstrado por imunofluorescência que anticorpos presentes no soro também podem adsorver-se na superfície da levedura (Muniz-junqueira, et al., 2003).

Utilizou-se para o preparo da levedura, a quantidade de 50g de fermento fresco de pão (Fleischmann) dissolvidos em 220 mL de solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2, e autoclavados a 120°C, por trinta minutos, sendo em seguida lavada com STF até a obtenção de sobrenadante límpido. Ao sedimento foram adicionados 28 mL de STF contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol, e a suspensão foi incubada a 37°C por 2 horas, em agitação. Após este procedimento, a suspensão foi lavada três vezes por centrifugação para retirada do 2-mercaptoetanol e novamente suspensa em 55 ml de solução de 0,02M de iodoacetamida em STF, seguida de nova incubação por 2 horas à temperatura ambiente, com agitação. As leveduras foram lavadas três vezes por centrifugação em STF, suspensas em 220 ml de STF e o pH acertado para 7,2. Em seguida a preparação foi novamente autoclavada a 120°C, durante 30 minutos, e lavada com STF, por meio de centrifugação até que o sobrenadante se apresentasse

límpido, sendo então suspensa em 110 ml de tampão veronal pH 7,2, contendo azida sódica (200 mg/L), com o objetivo de preservá-las. Ao final deste processo de preparação das leveduras, elas eram mantidas a 4°C para serem utilizadas em cada experimento.

Para cada experimento, era retirado 25 µL da suspensão estoque, que era lavada três vezes por centrifugação em STF, pH 7,2. As leveduras eram quantificadas em câmara de Neubauer, e em seguida suspensas em RPMI 1640 (Gibco) e incubadas com soro fetal bovino (Gibco) a 10%, previamente inativado a 56°C, por 30 minutos, em banho-maria, a 37°C por 30 min.

5.4.c. Influência do tratamento de manutenção com corticóide inalatório sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos de indivíduos com asma e controles pelos receptores para opsoninas.

As frações do complemento, particularmente o componente C3, são encontradas no soro fresco, e quando incubados com leveduras, a 37°C, elas se adsorvem à sua superfície. Considerando que os monócitos e neutrófilos possuem receptores para a fração C3 do complemento, esse componente adsorvido à levedura funciona como uma opsonina, ligando-se à levedura por um lado e ao fagócito por outro, o que facilita a fagocitose.

Para testar a fagocitose por meio dos receptores dos fagócitos para componentes do sistema complemento e fração Fc da imunoglobulina G, o teste a fagocitose foi realizado como descrito acima (item 3.3), substituindo-se o soro fetal bovino inativado, pelo soro fresco do próprio indivíduo doador visando à sensibilização das leveduras, obtida após incubação a 37°C, por 30 minutos, em

banho-maria com o soro fresco a 10% do mesmo indivíduo que os fagócitos estavam sendo testados.

5.5. Influência do tratamento de manutenção com corticóide inalatório sobre a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos de crianças com asma, pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (nbt).

Para avaliar a influência do tratamento com corticóide inalatório sobre a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos de pacientes com asma foi realizado o teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT), que detecta de forma indireta a produção de ânions superóxido (O_2^-) (Lachman et al., 1997). Por ser o NBT um receptor de elétrons, no processo de redução ele se converte de um composto amarelo e solúvel em um material insolúvel de cor azul que precipita no citoplasma da célula, podendo ser visto por microscopia óptica e quantificado pelo número de células que apresentam o corante no citoplasma. Desta forma, a proporção de células que apresentam o corante no citoplasma se relaciona quantitativamente com a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos (Nydegger, 1973).

Para se realizar o teste do NBT basal, os fagócitos aderidos à lamina, como previamente descrito (item 3.3), foram incubados por 20 min com 20 μ L de NBT a 0,05% em Hanks-triz, em câmara úmida, a 37°C. Em seguida, as preparações eram lavadas com STF, sendo utilizado o Hanks-triz com SFB a 30% na última lavagem. Era usado vento quente para a secagem das preparações, seguidas de fixação com metanol por 1 minuto e contra-coloração com safranina a 1,4% por 5 minutos, para possibilitar a visualização dos núcleos dos fagócitos.

A fim de analisar a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos estimulados, foi realizado o mesmo teste acima descrito incubando-se os fagócitos concomitantemente com o NBT e com $6,25 \times 10^4$ leveduras sensibilizadas por preparação, seguido de análise ao microscópio óptico da porcentagem de fagócitos que reduziram o corante NBT, concomitantemente, a presença de leveduras fagocitadas pela mesma célula.

5.6. Influência do tratamento com corticóide inalatório sobre o estado de ativação dos eosinófilos de crianças com asma, avaliados por parâmetros morfológicos.

Para avaliar a influência do tratamento com corticóide inalatório sobre o estado de ativação dos eosinófilos foram estudadas 149 crianças com asma e 26 crianças controles normais, caracterizando os aspectos morfológicos dos eosinófilos analisadas após pela aderência à lâmina de microscopia.

Para avaliar o estado de ativação dos eosinófilos pelos aspectos morfológicos, foi realizada a aderência à lâmina como descrito no item 3.3 e na sequência, as células não aderentes (eritrócitos e linfócitos) foram retiradas por lavagem com STF, pH 7,2 a 37°C, permanecendo uma monocamada de células aderentes (neutrófilos, monócitos e eosinófilos), que foi então fixada com metanol por 2 minutos e corada com Giemsa a 10% em tampão para coloração pH 6,8.

O estado de ativação dos eosinófilos foi avaliado por parâmetros morfológicos em 200 eosinófilos por preparação. A análise foi realizada ao microscópio óptico quantificando-se para cada criança o grau de ativação dos eosinófilos pela porcentagem de eosinófilos normais e os que estavam

apresentando uma ou mais das seguintes alterações morfológicas: espraçamento, emissão de grânulos (leve, moderada, acentuada), presença de vacúolos, presença de pseudópodes (localizado, generalizado) e aspecto de degeneração celular (Muniz-Junqueira, 2013).

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a aplicação dos testes estatísticos verificou-se previamente a normalidade ou não das variáveis nas amostras. Para comparação entre dois grupos com distribuição normal foi utilizado o teste t, e para aqueles com distribuição não normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparação entre mais do que dois grupos com distribuição normal foi utilizado o teste de ANOVA seguido do método de Neuman-Keuls para comparação entre os grupos, e para aqueles com distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos.

Para analisar a correlação entre as variáveis foi feito o teste de correlação de Pearson, para amostras com distribuição normal, e o teste de Spearman para amostras com distribuição não normal.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bicaudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor do que 5% ($p < 0,05$).

Os dados foram expressos graficamente como mediana, quartis e extremos. Os valores *outliers* estão mostrados nos gráficos.

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o software Prism® versão 5.0 (GraphPad, USA, 2005) e SPSS *Statistics* 19 (2010).

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Entre os indivíduos estudados para avaliação da ativação dos eosinófilos a classificação da gravidade da asma foi: asma intermitente (26 indivíduos/149; 17,4%), asma persistente leve (63/149; 42,28%), asma persistente moderada (41/149; 27,5%) e asma persistente grave (19/149; 12,75%). Para estudo das funções dos fagócitos foram estudados 58 indivíduos classificados quanto à gravidade da asma em: asma intermitente (7 indivíduos/58; 12,06%), asma persistente leve (24/58; 41,37%), asma persistente moderada (20/58; 34,48%) e asma persistente grave (14/58; 24,13%).

Para fins de avaliação da influência da asma sobre as funções dos fagócitos e ativação dos eosinófilos foram comparados os parâmetros em avaliação entre os indivíduos normais e os indivíduos com asma antes do tratamento. Para avaliar a influência do tratamento com corticóide inalatório foram comparados os parâmetros entre os indivíduos asmáticos antes, após três e seis meses de tratamento. Tabelas 1 e 2 e Figuras 2, 3 e 4.

Tabela 1- Caracterização demográfica e antropométrica dos indivíduos que participaram do estudo e tipo de corticóide utilizado

	Controle (n=26)	Asma intermitente (n=26)	Asma Persistente Leve (n=63)	Asma Persistente Moderada (n=41)	Asma Persistente Grave (n=19)
Idade	11, 115 (4,7-17,0)	8, 631 (2,5-15,9)	5, 789 (2,0-12,5)	8, 997 (2,4-16,2)	8, 425 (3,0-15,3)
IMC	18, 3154 (14,00- 27,23)	16,9873 (11,20-24,84)	16, 0540 (12,00-21,40)	17, 4795 (12,80-25,80)	18, 0647 (14,08-24,30)
Z-escore	1,242 (-1,77-2,02)	,1419 (-2,97 - 5,97)	-,0208 (-4,15 - 3,15)	1,317 (-2,73 - 2,25)	,439 (-2,58 - 4,23)
Gênero Masculino/ Feminino	12/14	15/11	39/24	22/19	9/10
Tratamento* **					
CI (%)			63/63 (100%)	12/41 (29,2%)	06/19 (31,57%)
CI + LABA (%) Budesonida + formoterol			0/63 (0%)	20/41 (48,7%)	08/19 (42.1%)
Propionato de fluticasona + Salmeterol			0/63 (0%)	09/41 (21,9%)	05/19 (26.3%)

Tabela 2 – Características clínicas, laboratoriais e funcionais de crianças amáticas antes, depois de 3 e de 6 de terapia com corticóide inalatório.

PARÂMETROS	CTR	Antes	3 Meses	6 Meses	Teste P
PFE (%)	85.5 (72-99) (54-136) Teste de Mann-Whitney P=0.39				
APL		85 (69-94) (35-126)	88 (80-100) (44-137)	96 (77-104) (54-108.5)	P=0.058 Kruskal-Wallis/Dunn's
APM	P=0.016	74 (33.5-(64.25) (49-118)	80 (72-94) (43-123)	90 (71-100) (54-120)	P=0.033 Kruskal-Wallis/Dunn's
APG	P=0.014	70 (62-82) (43-97)	78.5 (69.5-87.7) (32-100)	78 (68-95.38) (46-105)	P=0.52 Kruskal-Wallis/Dunn's
ACT					
APL		20 (18-21) (11-23)	23 (20-24) (16-25)	23 (20-24) (14-25)	P<0.0001 Kruskal-Wallis/Dunn's
APM		17 (15-19) (12-24)	21 (18-23) (15-25)	23 (19-24.5) (12-25)	P<0.0001 Kruskal-Wallis/Dunn's
APG		16 (14-18) (10-20)	19 (18-21) (15-24)	19 (19-22) (17-24)	P<0.0001 Kruskal-Wallis/Dunn's
Porcentagem de eosinófilos circulantes no sangue periférico	3.69 (1.8-4.8) (0.85-21.7) Teste de Mann-Whitney P=0.28				
APL		3.76 (2.21-7.8) (0.14-18.4)	4.88 (2.6-7.8) (0.32-24.8)	4.56 (2.46-8.8) (0.31-24.3)	P=0.28 teste de Mann-Whitney P=0.68 Kruskal-Wallis/Dunn's
APM	P=0.0024	6.7 (3.4-10.2) (0.13-16.3)	5.6 (3.5-8.9) (1.2-19)	6.11 (3.4-9.6) (1.12-19.5)	P=0.0024 teste de Mann-Whitney P=0.90 Kruskal-Wallis/Dunn's
APG	P=0.17	4 (2,52-9.17) (0.73-26)	6.7 (4.02-13.7) (2.1-18)	5.5 (3.03-12.4) (0.99-21.8)	P=0.17 teste de Mann-Whitney P=0.37 Kruskal-Wallis/Dunn's

APL(asma persistente leve), APM (asma persistente moderrada), APG (asma persistente grave), CTR (controles), PFE (pico de fluxo expiratório), Kruskal-Wallis + Dunn's –após o tratamento, teste de Mann-Whitney - antes do tratamento. Valores em mediana, quartis e extremos.

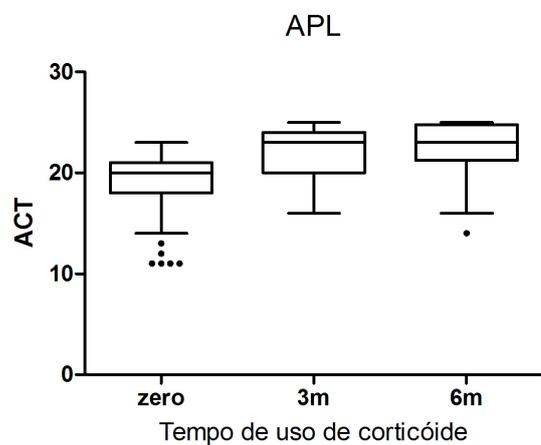
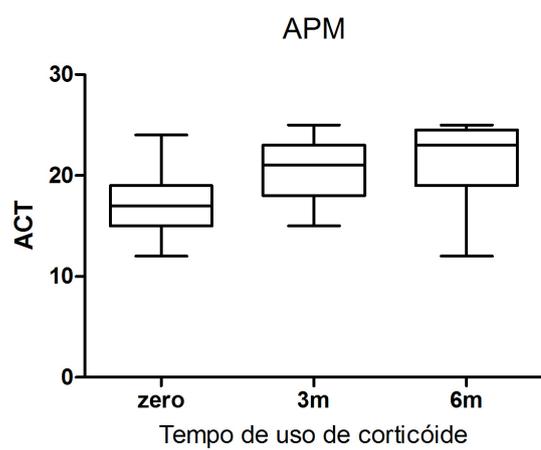
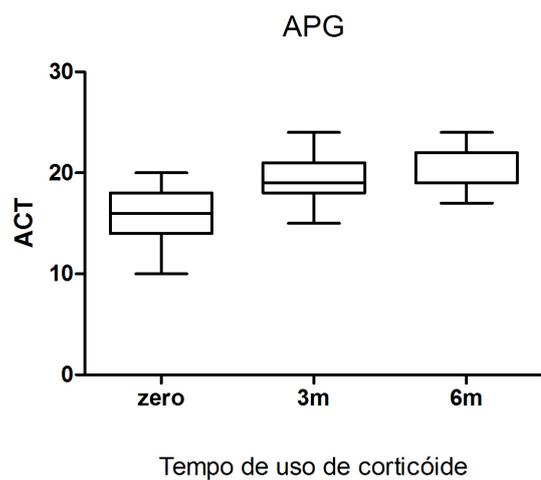


Figura 2 - ACT antes e após tratamento nas crianças com asma

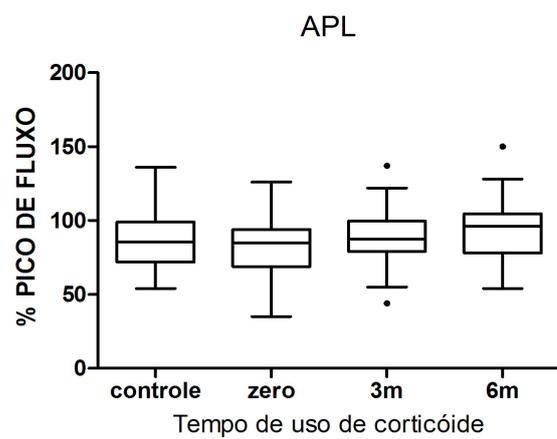
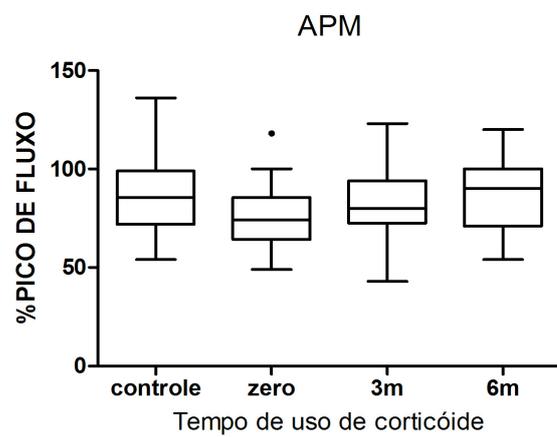
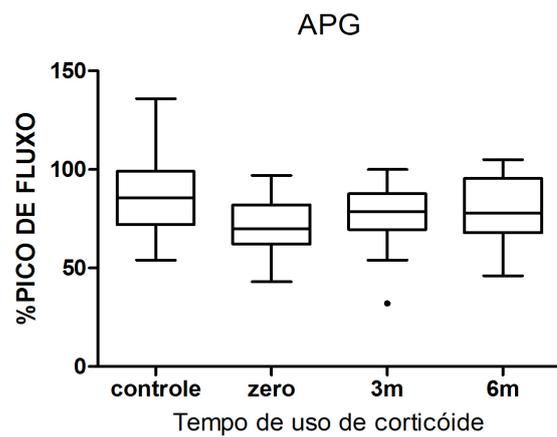


Figura 3 – Pico de Fluxo Expiratório antes e após tratamento nas crianças com asma e controles.

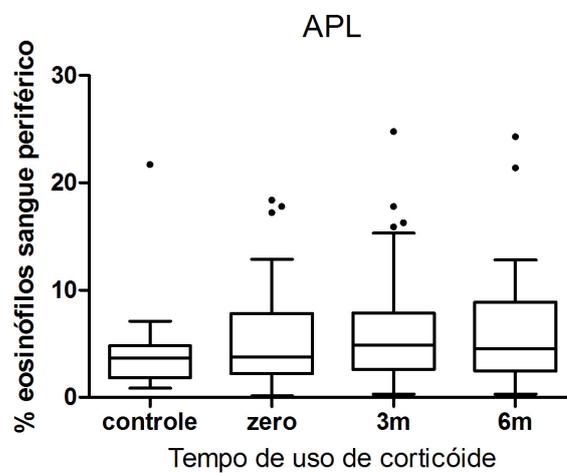
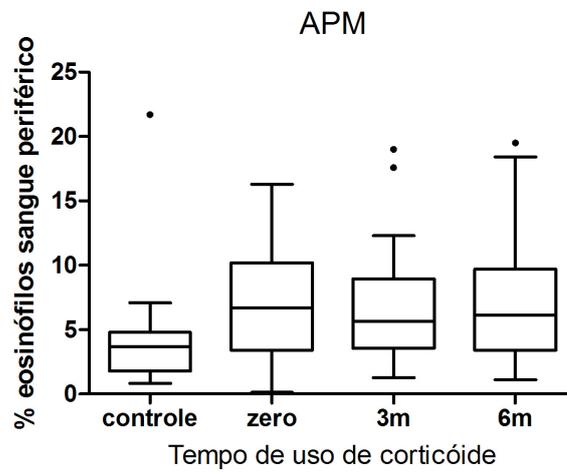
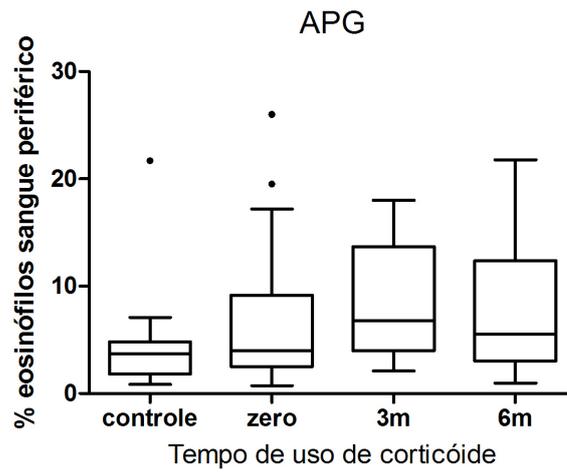


Figura 4 – Porcentagem de eosinófilos no sangue periférico, antes e após tratamento nas crianças com asma e controles.

6.2. INFLUÊNCIA DO CORTICÓIDE INALATÓRIO SOBRE O ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS EM CRIANÇAS COM ASMA LEVE, MODERADA OU GRAVE E CONTROLES, ANTES E APÓS 3 E 6 MESES DE TRATAMENTO.

O estado de ativação dos eosinófilos foi avaliado por parâmetros morfológicos em 200 eosinófilos por preparação. A análise foi feita ao microscópio óptico quantificando-se a porcentagem de eosinófilos apresentando: aspecto normal, espraçamento, emissão de grânulos (em pequena, moderada ou grande quantidade), presença de vacúolos, presença de grânulos isolados, presença de pseudópodes (localizados ou generalizados), contato entre células e degeneração celular. Os dados foram expressos em mediana, quartis e extremos.

6.2.1. Eosinófilos normais

A mediana da porcentagem de eosinófilos normais não ativados para as crianças com asma persistente leve (63,0%) antes do início do tratamento com corticóide inalatório foi menor do que a mediana da porcentagem de eosinófilos normais não ativados das crianças controle normais (90,25%) ($P < 0.0001$, teste de Mann Whitney). Após 6 meses de tratamento com corticóide inalatório houve aumento significativo da porcentagem de eosinófilos normais não ativados, tanto para o grupo com APL (85,0%) ($P < 0.0001$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, zero e 3 meses $<$ 6 meses) quanto APM (86,0%) ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, zero e 3 meses $<$ 6 meses). Entretanto, 6 meses não foi suficiente para aumentar o número eosinófilos normais não ativados das crianças com APG ($p = 0.15$, teste de Kruskal-Wallis). Figura 5.

A mediana da porcentagem de eosinófilos normais não ativados para as crianças com asma intermitente (75,0%) foi menor do que a mediana da

porcentagem de eosinófilos normais não ativados das crianças controle normais (90,25%) ($P < 0.0001$, teste de Mann Whitney).

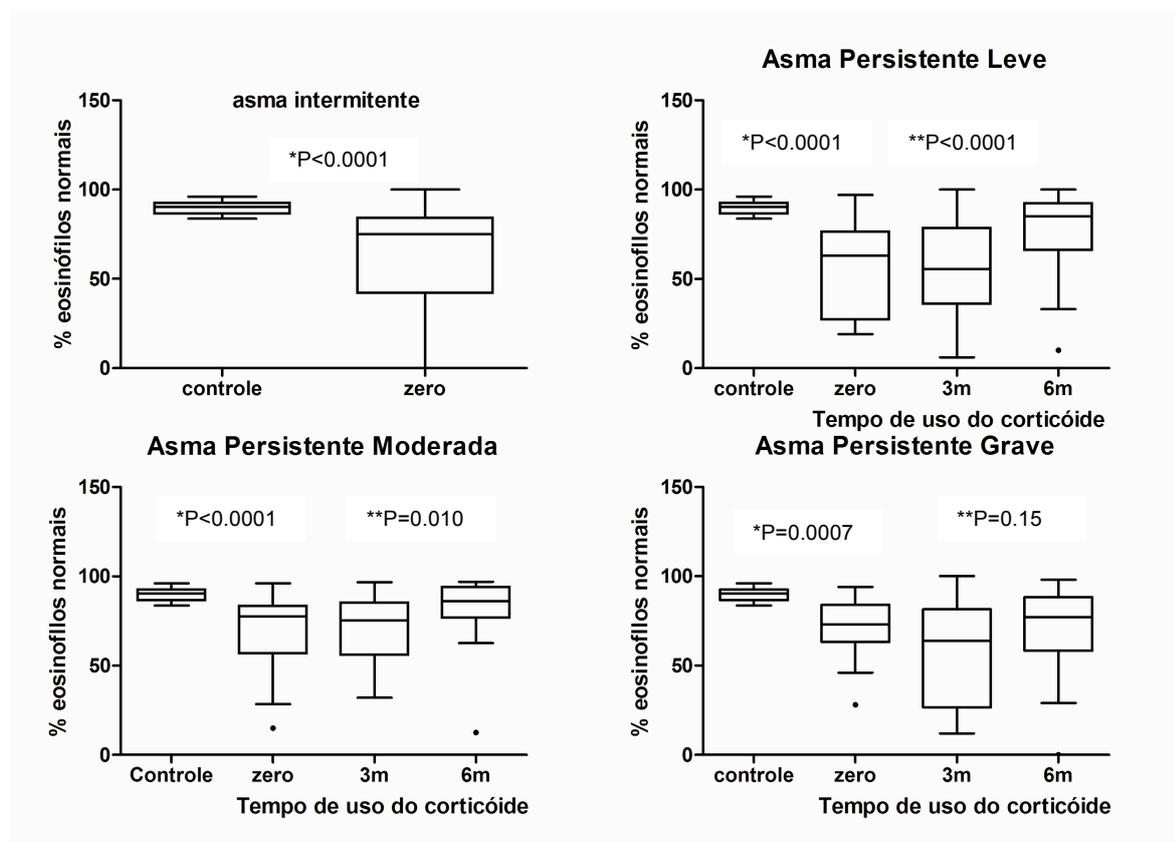


Figura 5. Porcentagem de eosinófilos normais não ativados à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide.

6.2.2. Eosinófilos espriados

As medianas das porcentagens de eosinófilos espriados para as crianças com asma persistente leve (6,0%) ($p = 0.003$, teste de Mann Whitney), moderada (6%) ($p < 0.002$, teste de Mann-Whitney) e grave (2%) ($p < 0,04$, teste de Mann Whitney) antes do início do tratamento com corticóide inalatório foi maior do que a mediana da porcentagem de eosinófilos espriados das crianças controle normais

(0,95%). Somente após 6 meses de tratamento com corticóide inalatório houve diminuição significativa da porcentagem de eosinófilos espreiados, tanto para o grupo com APL (0,0%) ($p=0.0009$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, zero e 3 meses > 6 meses), quanto APM (0,0) ($p=0.0038$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, zero > 6 meses). Entretanto, 6 meses não foi ainda suficiente para diminuir o número de eosinófilos espreiados das crianças com APG ($p=0,42$, teste de Kruskal-Wallis). Figura 6.

Para as crianças com asma intermitente, a mediana da porcentagem de eosinófilos espreiados (3.95%) também foi maior do que a das crianças controle normais (0,95%) ($p=0,02$, teste de Mann Whitney). (Figura 6)

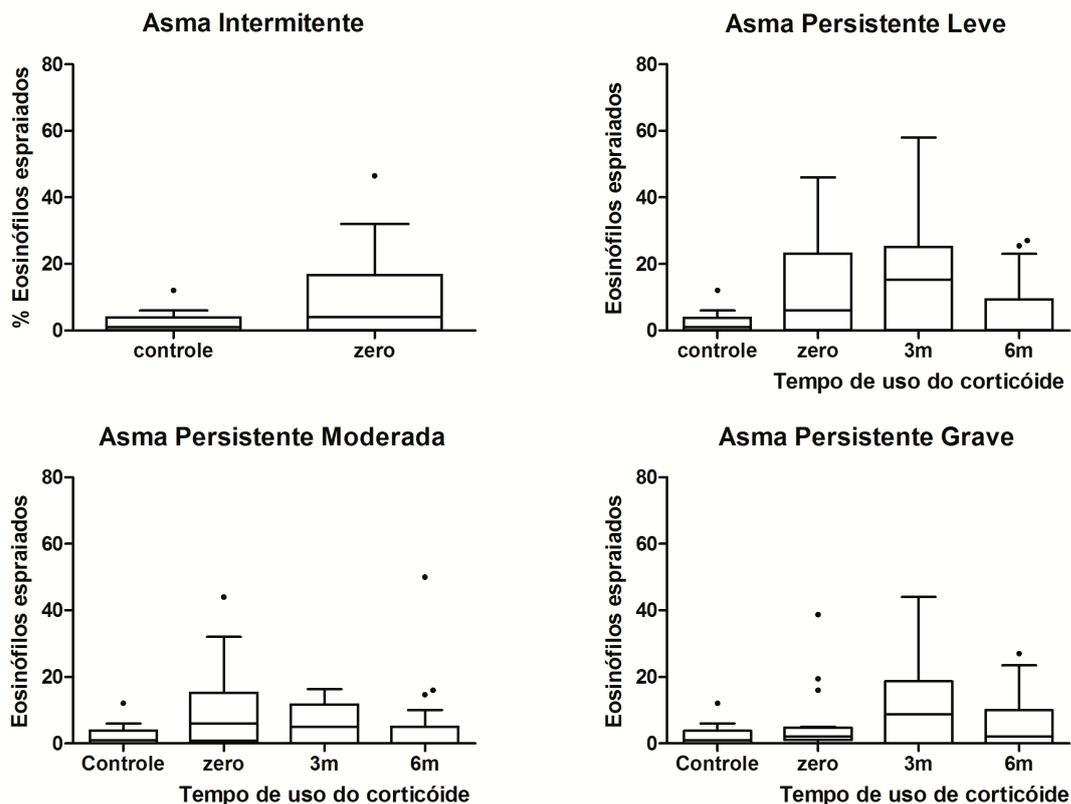


Figura 6. Porcentagem de eosinófilos espraçados à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide.

6.2.3. Eosinófilos emitindo grânulos em pequena, média ou grande quantidade em crianças com APL, APM e APG

As crianças com asma persistente leve apresentaram maior porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em pequena (20,25% versus 5,75%; $p < 0.0001$, teste de Mann Whitney) e moderada (3% versus 0%; $p < 0.04$, teste de Mann Whitney) quantidade antes do início do tratamento com corticóide inalatório comparado as crianças controle normais. Para emissão de grânulos em grande quantidade, não houve diferença estatística entre as crianças asmáticas e

controles normais (0 versus 0%) ($p < 0.16$, teste de Mann Whitney). Somente após 6 meses de tratamento com CI a diminuição da porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em pequena e moderada quantidade foi estatisticamente significativa (Figura 7, 8 e 9). Resultados semelhantes foram observados para as crianças com asma persistente moderada. Figura 8.

Para as crianças com APG houve um aumento da porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em grande quantidade no terceiro mês de tratamento com IC ($p = 0.03$, Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, $3m > zero$). Figura 9

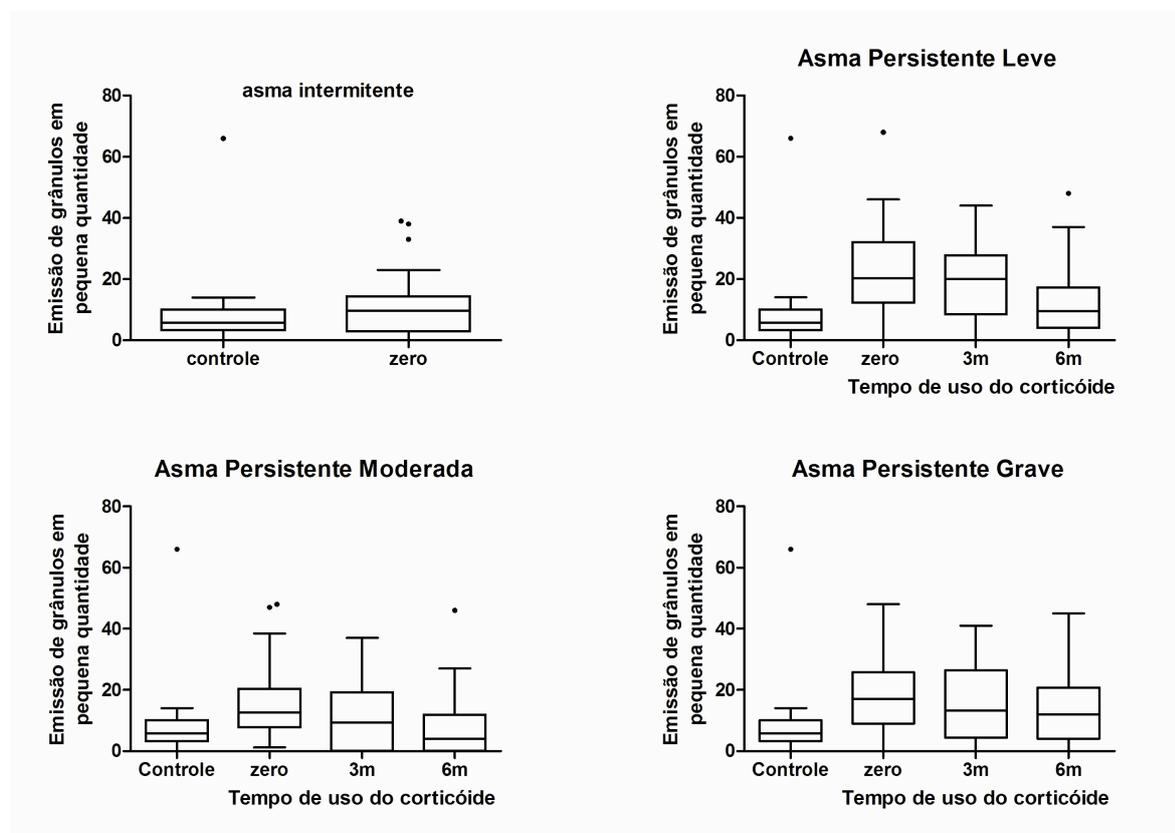


Figura 7. Porcentagem de eosinófilos emitindo granulações em pequena quantidade à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

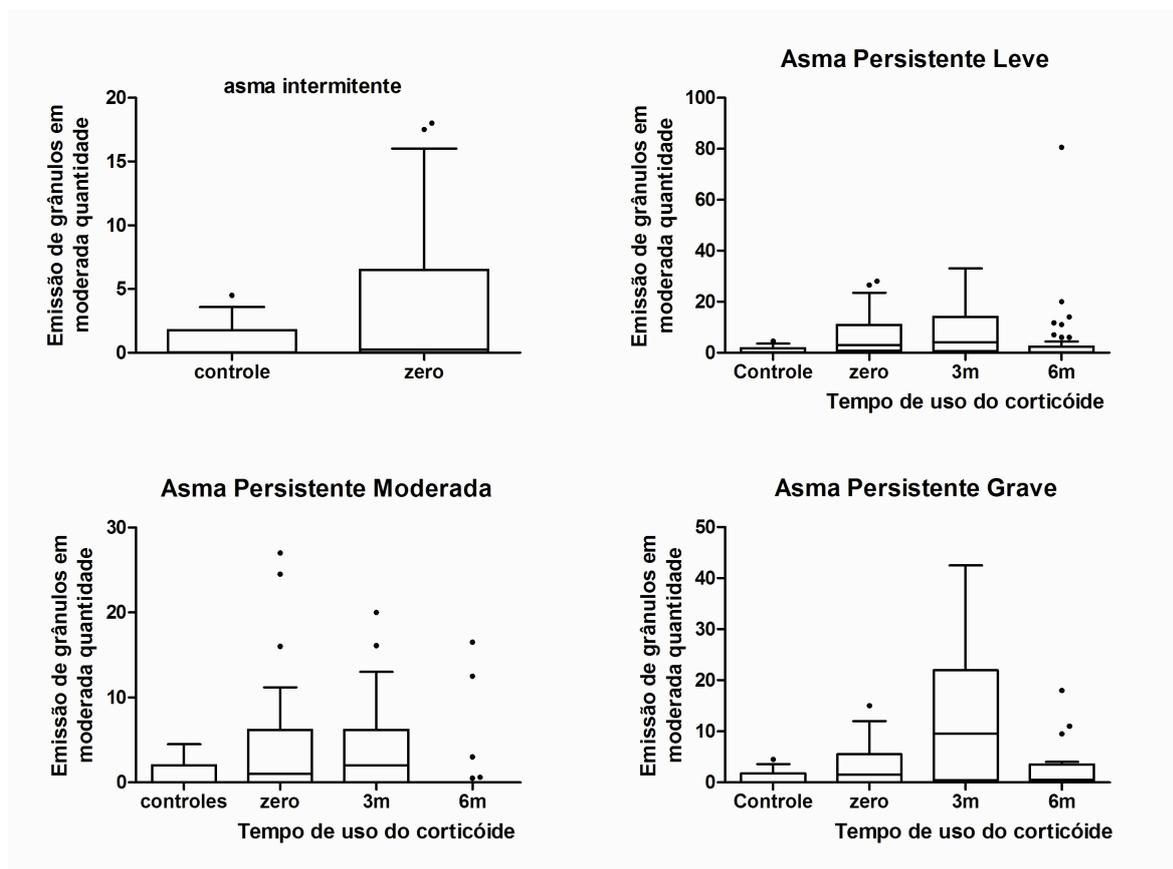


Figura 8. Porcentagem de eosinófilos emitindo granulações em moderada quantidade à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

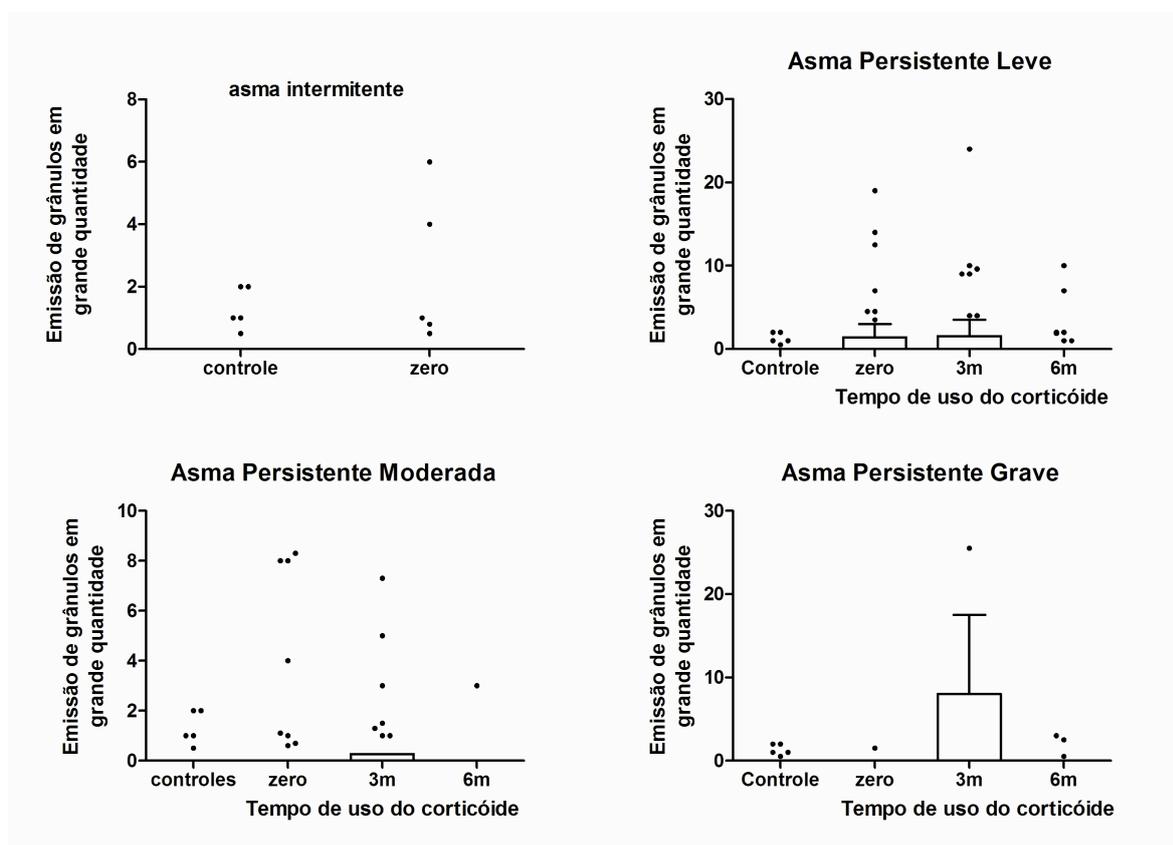


Figura 9. Porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em grande quantidade à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

6.2.4. Eosinófilos apresentando vacúolos em crianças com APL, APM e APG

Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de eosinófilos com presença de vacúolos entre as crianças com asma em nenhuma de suas classificações: asma intermitente ($p=0.22$. Mann-Whitney teste), asma persistente leve ($p=0.98$. Mann-Whitney teste; $p=0,68$. Kruskal-Wallis/Dunn's), asma persistente moderada ($p=0.21$. Mann-Whitney teste; $p=0.40$. Kruskal-Wallis/Dunn's) e asma persistente grave ($p=0.10$. Mann-Whitney teste; $p=0.29$. Kruskal-Wallis/Dunn's), respectivamente, antes e após o tratamento por seis

meses com corticóide inalatório, em comparação com as crianças controle normais. (Figura 10).

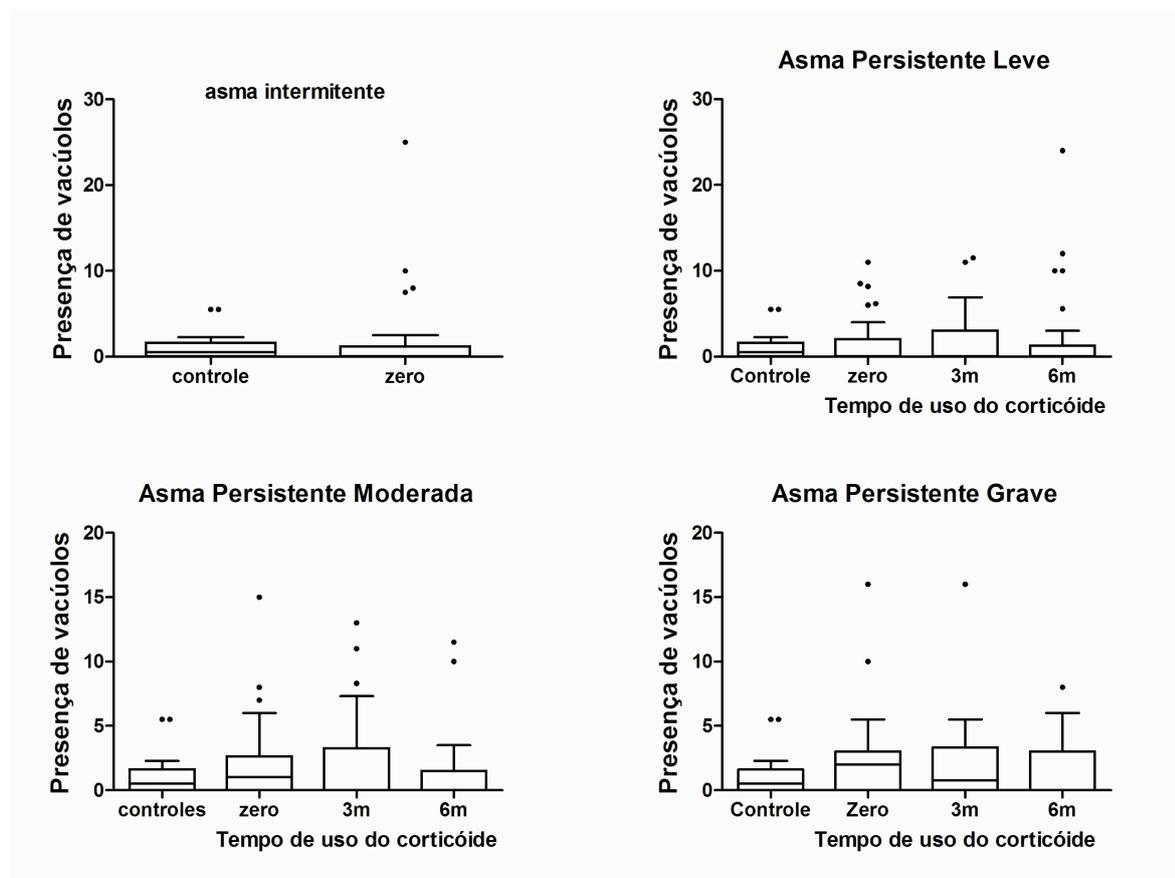


Figura 10. Porcentagem de eosinófilos com presença de vacúolos à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

6.2.5. Eosinófilos emitindo pseudópodes localizados e generalizados em crianças com APL, APM e APG

As crianças com asma persistente leve apresentaram maior porcentagem de eosinófilos emitindo pseudópodes localizados antes do início do tratamento com corticóide inalatório (1,5%) comparado as crianças controle normais (0,0%) ($p=0.0076$, Mann Whitney teste). Já aos 3 meses após o tratamento com

corticóide inalatório a emissão de pseudópodes localizados encontrava-se significativamente menor do que antes do tratamento ($p=0.0033$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, $3 \text{ e } 6 \text{ m} < \text{zero}$)

Resultado semelhante foi observado para as crianças com APM (Figura 11) As diferenças não foram estatisticamente significantes para as crianças com APG. (Figura 11)

Não houve diferença significativa quanto a emissão de pseudópodes generalizados nas crianças com asma e nos controles.

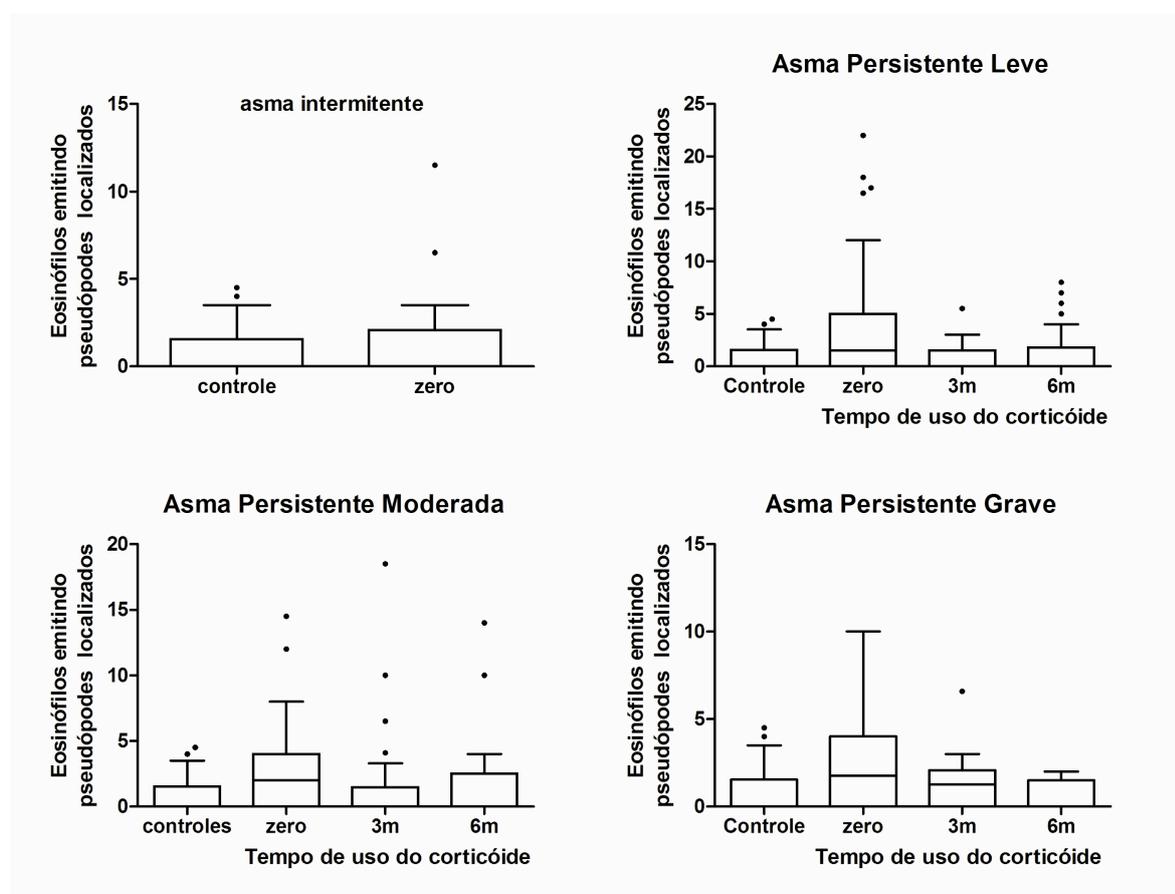


Figura 11. Porcentagem de eosinófilos emitindo pseudópodes localizados à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

6.2.6. Eosinófilos apresentando contato com outras células em crianças com APL, APM e APG

A porcentagem de eosinófilos que apresentavam contato entre células foi maior nas crianças com APL do que nas crianças controles normais, antes do tratamento. Após o tratamento, para crianças com APL e com APM houve diminuição da porcentagem de células em contato com outras células ($p=0.049$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos; $3m>6m$). (Figura 12)

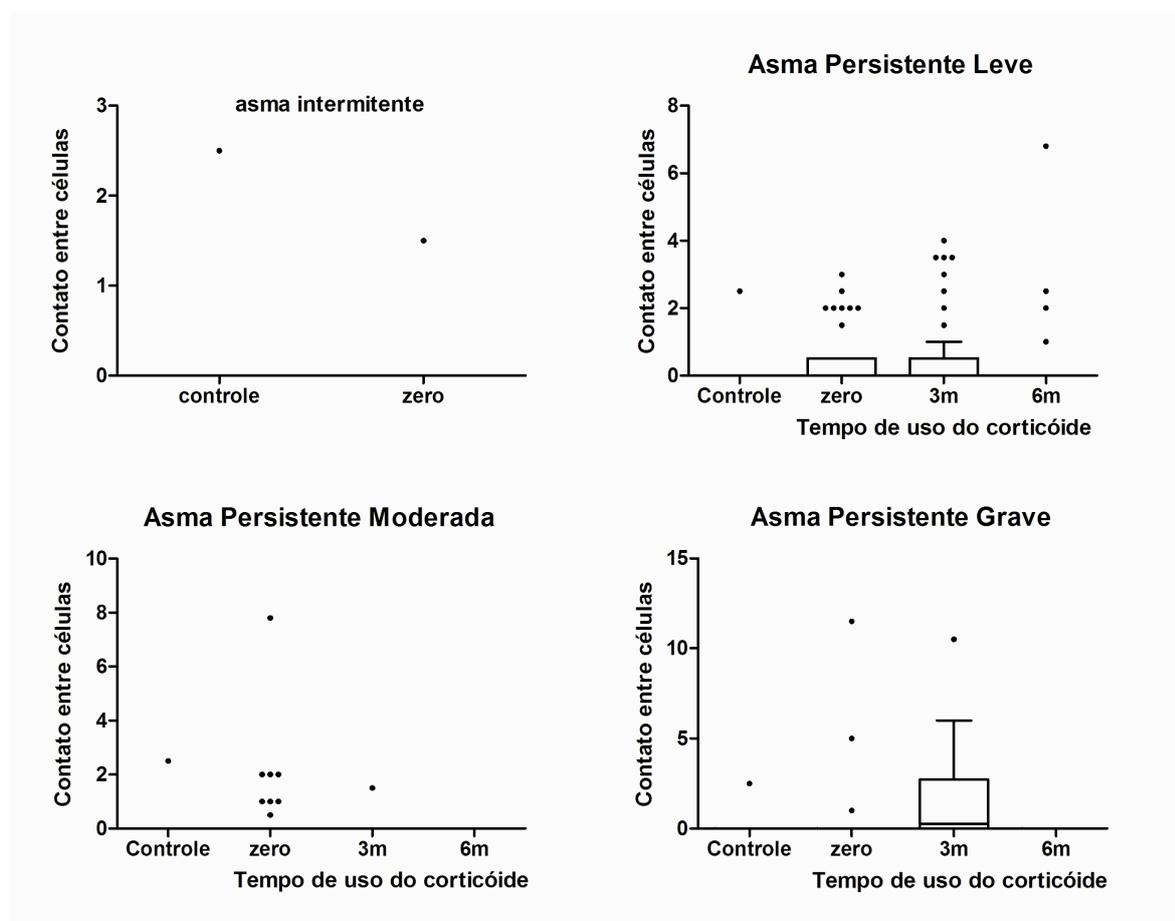


Figura 12. Porcentagem de eosinófilos com contato entre células à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

6.2.7. Eosinófilos com aspecto em degeneração em crianças com APL, APM e APG

A porcentagem de eosinófilos com degeneração celular foi maior nas crianças com APL do que nas crianças controles normais, antes do tratamento. E após seis meses de tratamento, para crianças com APM houve diminuição da porcentagem de eosinófilos com aspecto em degeneração celular ($p=0.049$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). (Figura 13 e Tabelas)

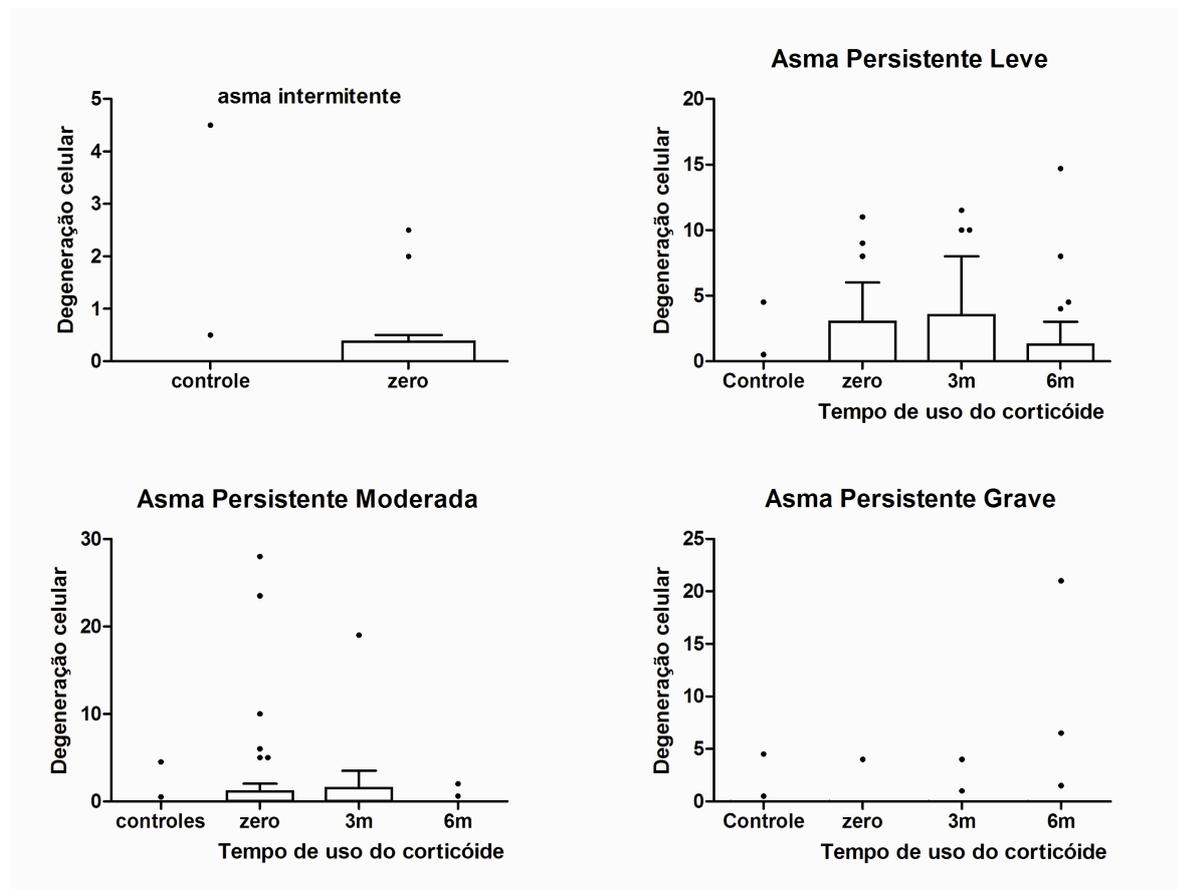


Figura 13. Porcentagem de eosinófilos com degeneração celular à análise morfológica em crianças com asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada e asma persistente grave e crianças controle normais antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

Nas figuras 14, 15, 16 e 17 e tabelas 3, 4 ,5 e 6, os parâmetros de ativação do eosinófilos estão representados pela forma e gravidade da doença.

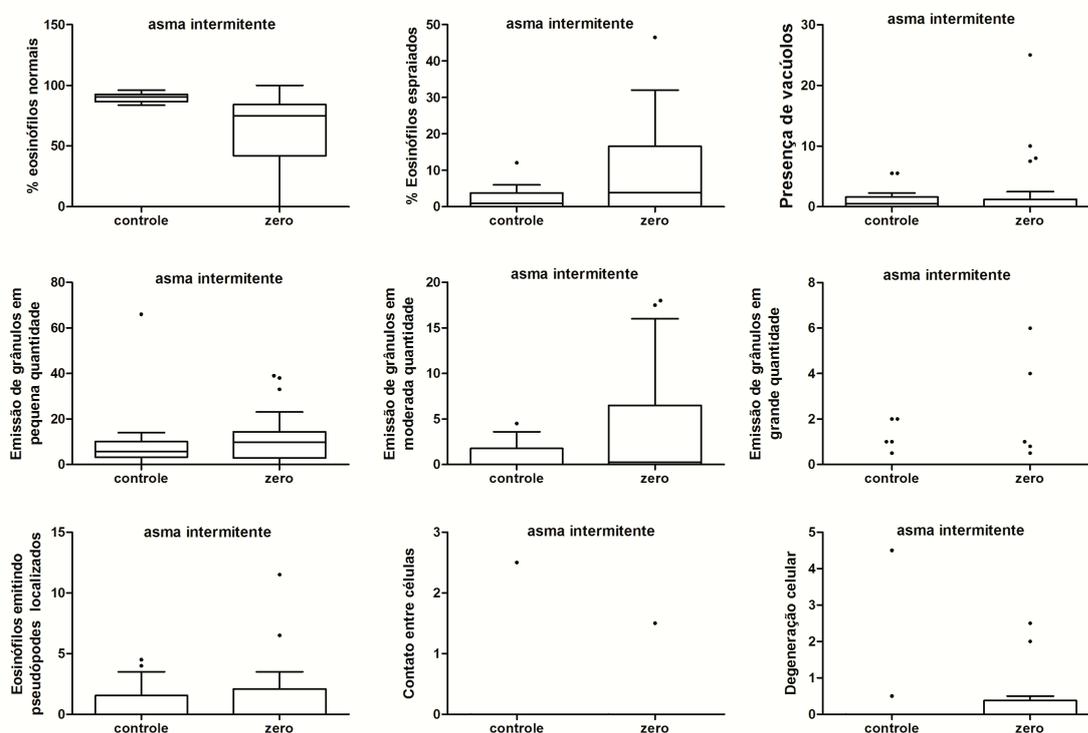


Figura 14. Porcentagem de eosinófilos ativados pela análise morfológica em crianças com asma intermitente e crianças controle normais. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

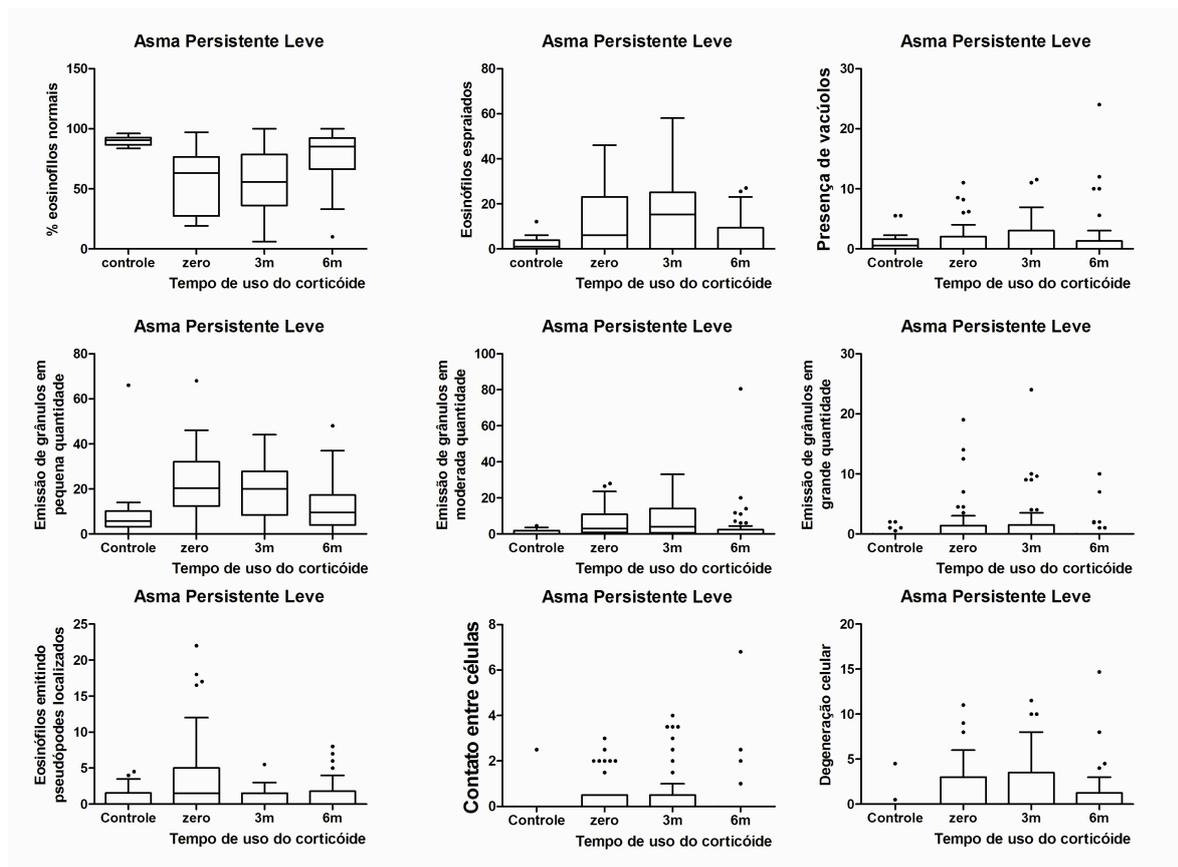


Figura 15. Porcentagem de eosinófilos ativados pela análise morfológica em crianças controle normais e crianças com asma persistente leve antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

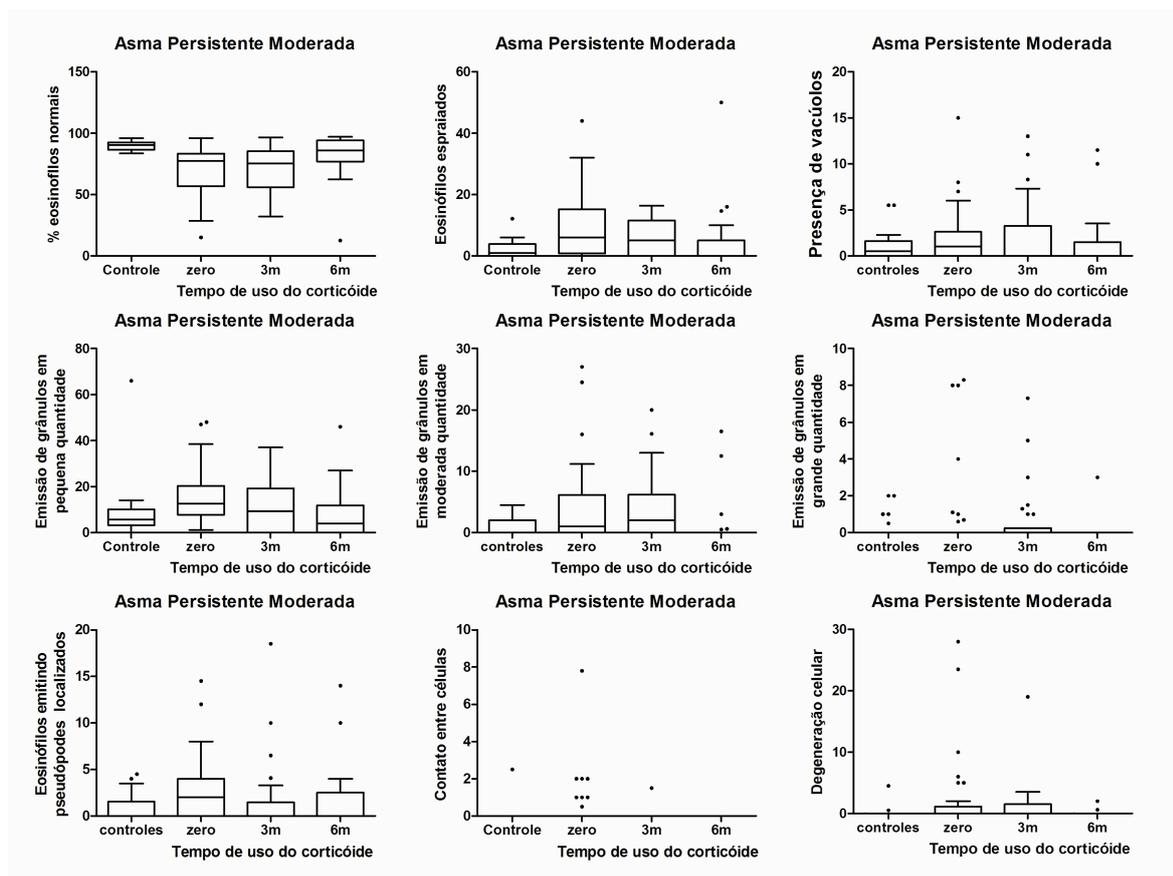


Figura 16. Porcentagem de eosinófilos ativados pela análise morfológica em crianças controle normais e crianças com asma persistente moderada antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

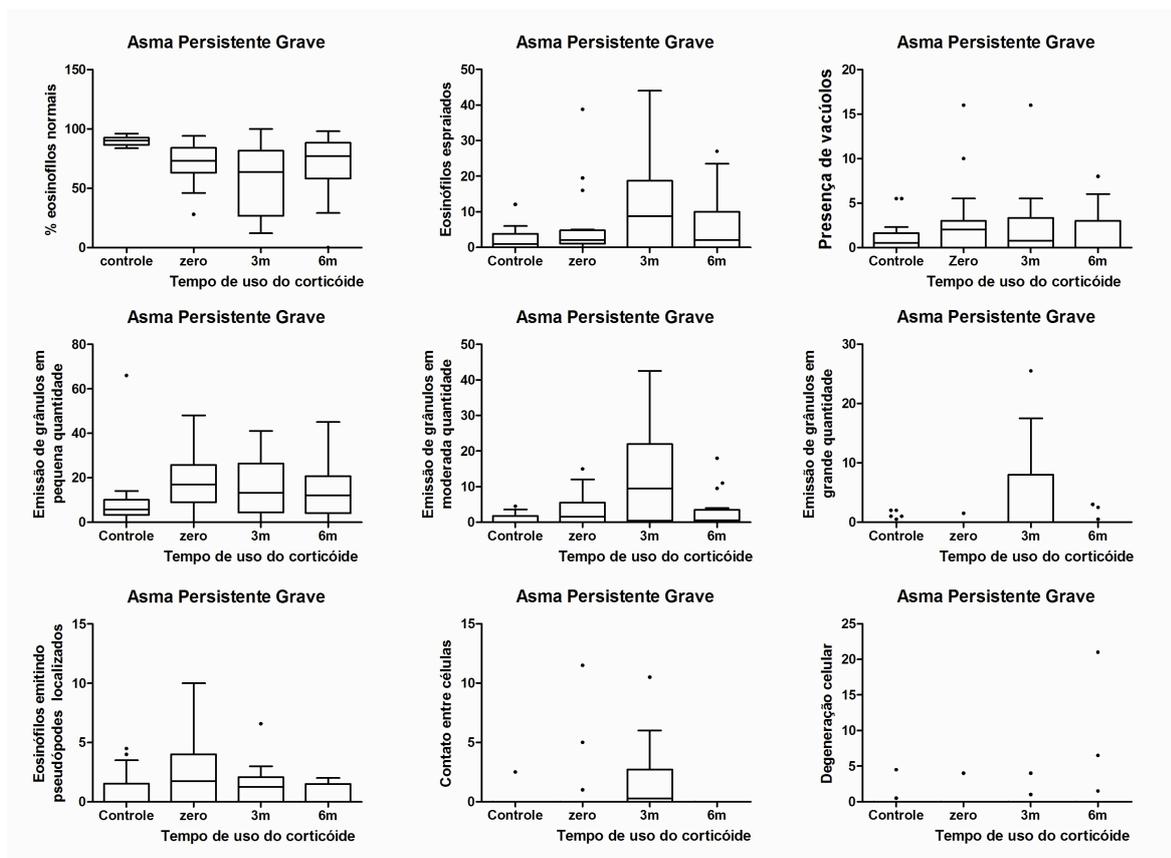


Figura 17. Porcentagem de eosinófilos ativados pela análise morfológica em crianças controle normais e crianças com asma persistente grave antes e durante o tratamento com corticóide inalatório. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

Tabela 3- Estado de ativação dos eosinófilos de indivíduos com asma persistente leve (APL) e controles normais e comparação dos tempos de tratamento, com valores expressos em mediana, quartis e extremos e valor do p .

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS EOSINÓFILOS	Crianças controles normais (teste de Mann-Whitney)	APL Tempo Zero	APL 3 meses	APL 6 meses (Kruskal-Wallis/Dunn's)
Espraiamento	0.95 (0.0-3.8) (0.0-12.10) $p=0.003$	6.0 (0.0-23.0) (0.0-46.0)	15.3 (0.0-25.0) (0.0-58.0)	0.0 (0.0-9.3) (0.0-27) $p=0.0009$
Emissão de grânulos em pequena quantidade	5.75 (3.35-10.10) (0.0-66.0) $P<0.0001$	20.25 (12.33-32.0) (0.0-68.0)	20.0 (8.4-27.7) (0.0-44.0)	9.5 (4.0-17.25) (0.0-48.0) $p=0.038$
Emissão de grânulos em moderada quantidade	0.0 (0.0-1.75) (0.0-4.5) $p=0.0001$	3.0 (0.67-10.9) (0.0-28.0)	4.0 (0.50-14.0) (0.0-33.0)	0.0 (0.0-2.25) (0.0-80.5) $p<0.0001$
Emissão de grânulos em grande quantidade	0.0 (0.0-0.0) (0.0-2.0) $p=0.16$	0.0 (0.0-1.37) (0.0-19.0)	0.0 (0.0-1.5) (0.0-24.0)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-10.0) $p=0.07$
Presença de vacúolos	0.50 (0.0-1.6) (0.0-55.0) $p=0.98$	0.50 (0.0-2.0) (0.0-11.0)	0.50 (0.0-3.0) (0.0-11.5)	0.50 (0.0-1.3) (0.0-24.0) $p=0.68$
Emissão de pseudópodes localizados	0.0 (0.0-1.5) (0.0-4.5) $p=0.0076$	1.5 (0.0-5.0) (0.0-22.0)	0.0 (0.0-1.5) (0.0-5.50)	0.0 (0.0-1.8) (0.0-8.0) $p=0.0033$
Contato entre células	0.0 (0.0-0.0) (0.0-25.0) $p=0.028$	0.0 (0.0-0.50) (0.0-30.0)	0.0 (0.0-0.50) (0.0-4.0)	0.0 (0.0-0.50) (0.0-6.80) $p=0.049$
Degeneração celular	0.0 (0.0-0.0) (0.0-4.5) $p=0.0072$	0.0 (0.0-3.0) (0.0-11.0)	0.0 (0.0-3.5) (0.0-11.5)	0.0 (0.0-1.25) (0.0-14.7) $p=0.08$

Tabela 4- Estado de ativação dos eosinófilos de indivíduos com asma persistente moderada (APM) e controles normais e comparação dos tempos de tratamento, com valores expressos em mediana, quartis e extremos e valor do p .

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS EOSINÓFILOS	Crianças controles normais (teste de Mann-Whitney)	APM Tempo zero	APM 3 meses	APM 6 meses (Kruskal-Wallis/Dunn's)
Espraiamento	0.95 (0.0-3.8) (0.0-12.10) $p=0.002$	6.0 (0.75-15.2) (0.0-44.0)	5.05 (0.0-11.6) (0.0-16.46)	0.0 (0.0-5.0) (0.0-50.0) $p=0.38$
Emissão de grânulos em pequena quantidade	5.75 (3.35-10.10) (0.0-66.0) $p=0.0003$	12.65 (7.75-20.38) (1.20-48.0)	9.4 (0.0-19.25) (0.0-37.0)	4.0 (0.0-11.9) (0.0-46.0) $p=0.0006$
Emissão de grânulos em moderada quantidade	0.0 (0.0-1.75) (0.0-4.5) $p=0.04$	1.0 (0.0-6.15) (0.0-27.0)	2.0 (0.0-6.17) (0.0-20.0)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-16.5) $p=0.0015$
Emissão de grânulos em grande quantidade	0.0 (0.0-0.0) (0.0-2.0) $p=0.76$	0.0 (0.0-0.0) (0.0-8.30)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-7.30)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-3.0) $p=0.16$
Presença de vacúolos	0.50 (0.0-1.6) (0.0-55.0) $p=0.21$	1.0 (0.0-2.6) (0.0-15.0)	1.0 (0.0-3.25) (0.0-13.0)	1.0 (0.0-1.5) (0.0-11.5) $p=0.40$
Emissão de pseudópodes localizados	0.0 (0.0-1.5) (0.0-4.5) $p=0.0062$	2.0 (0.0-4.0) (0.0-14.5)	0.0 (0.0-1.47) (0.0-18.5)	0.0 (0.0-2.5) (0.0-14.0) $p=0.03$
Contato entre células	0.0 (0.0-0.0) (0.0-25.0) $p=0.06$	0.0 (0.0-0.0) (0.0-25.0)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-7.80)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-0.0) $p=0.011$
Degeneração celular	0.0 (0.0-0.0) (0.0-4.5) $p=0.0072$	0.0 (0.0-1.2) (0.0-28.0)	0.0 (0.0-1.5) (0.0-28.0)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-2.0) $p=0.04$

Tabela 5 - Estado de ativação dos eosinófilos de indivíduos com asma persistente grave (APG) e controles normais e comparação dos tempos de tratamento, com valores expressos em mediana, quartis e extremos e valor do p .

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS EOSINÓFILOS	Crianças controles normais (teste de Mann-Whitney)	APG Tempo zero	APG 3 meses	APG 6 meses (Kruskal-Wallis/Dunn's)
Espraiamento	0.95 (0.0-3.8) (0.0-12.10) $p=0.07$	2.0 (0.0-4.75) (1.0-38.8)	8.7 (0.0-18.7) (0.0-44.0)	2.0 (0.0-10.0) (0.0-27.0) $p=0.42$
Emissão de grânulos em pequena quantidade	5.75 (3.35-10.10) (0.0-66.0) $p=0.0028$	17.0 (9.0-25.75) (0.0-48.0)	13.25 (4.3-26.43) (0.0-41.0)	12.0 (4.0-20.75) (0.0-45.0) $p=0.83$
Emissão de grânulos em moderada quantidade	0.0 (0.0-1.75) (0.0-4.5) $p=0.08$	1.50 (0.0-5.5) (0.0-15.0)	9.50 (0.37-21.98) 0.0-42.5)	0.50 (0.0-3.5) (0.0- 18.0) $p= 0.05$
Emissão de grânulos em grande quantidade	0.0 (0.0-0.0) (0.0-2.0) $p=0.0.26$	0.0 (0.0-0.0) (0.0-1.5)	0.0 (0.0-8.0) (0.0-25.5)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-3.0) $p=0.038$
Presença de vacúolos	0.50 (0.0-1.6) (0.0-55.0) $p=0.10$	2.0 (0.0-3.0) (0.0-16.0)	0.75 (0.0-3.3) (0.0-16.0)	0.0 (0.0-3.0) (0.0-8.0) $p=0.29$
Emissão de pseudópodes localizados	0.0 (0.0-1.5) (0.0-4.5) $p=0.10$	1.75 (0.0-4.0) (0.0-10.0)	1.25 (0.0-4.0) (0.0-10.0)	0.0 (0.0-1.50) (0.0-2.0) $p=0.09$
Contato entre células	0.0 (0.0-0.0) (0.0-25.0) $p=0.11$	00.0 (0.0-0.0) (0.0-11.5)	0.25 (0.0-2.7) (0.0-10.5)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-0.0) $p=0.0033$
Degeneração celular	0.0 (0.0-0.0) (0.0-4.5) $p=0.92$	0.0 (0.0-0.0) (0.0-4.0)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-4.0)	0.0 (0.0-0.0) (0.0-21.0) $p=0.59$

Tabela 6. Resumo das alterações morfológicas nos eosinófilos antes e após o tratamento.

	Eosino Normais	Esp	GP	GM	GG	Pseu Local	CC	DC	Vac
APL									
Antes									
Após									
APM									
Antes									
Após									
APG									
Antes									
Após									

Legenda: ESP (espraiamento), GP (grânulos em pequena quantidade), GM (grânulos em moderada quantidade), GG (grânulos em grande quantidade), Pseu Local (pseudópodes localizados), CC (contato entre células), DC (degeneração celular), Vac (vacúolo).

6.3. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CORTICÓIDE INALATÓRIO POR 6 MESES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ASMA PERSISTENTE LEVE, MODERADA OU GRAVE, NA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS, PELOS RECEPTORES QUE RECONHECEM PADRÕES MOLECULARES.

6.3.1. Influência do tratamento com corticóide inalatório sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, na presença de soro fetal bovino inativado.

A capacidade fagocitária dos neutrófilos das crianças com asma persistente leve foi significativamente menor do que o das crianças normais. E, embora tenha havido aumento da capacidade fagocitária após 6 meses de tratamento com o corticóide inalatório, os valores da capacidade fagocitária ainda foram menores do que a das crianças normais. (Figura 18)

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com asma persistente leve antes do início do tratamento com corticóide inalatório (6,0) foi significativamente menor do que a das crianças controle normais (19) ($p=0.0009$, Mann-Whitney teste). Após o tratamento com o corticóide inalatório a mediana do IF foi de 7,0 aos 3 meses e de 10,5 aos 6 meses de acompanhamento ($p=0,46$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), quando a fagocitose foi testada utilizando $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizado por escavação. Esta diminuição deveu-se ao menor número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos (1,13; 1,15; 1,28 e 1,44 respectivamente) em comparação as crianças controle normais ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), não havendo diferença

no envolvimento dos neutrófilos na fagocitose em comparação as crianças controle normais (4,75; 6,5; 6,5 e 15 respectivamente) ($p = 0,73$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). (Figura 18).

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos (10; 4,25 e 6) das crianças com asma persistente moderada, para a fagocitose testada utilizando-se $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, foi significativamente menor no início do tratamento do que a das crianças controles normais (19) ($p = 0,045$, teste de Mann Whitney), e o tratamento com corticóide modificou a capacidade fagocitária dos neutrófilos ($p = 0,02$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Esta diminuição deveu-se ao menor envolvimento dos neutrófilos na fagocitose comparados as crianças controle normais (6,75; 3,25; 5 e 15,0 respectivamente) ($p = 0,05$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), não havendo diferença no número médio de leveduras fagocitadas comparados as crianças controle normais (1,38; 1,37; 1,45 e 1,44 respectivamente) ($p = 0,76$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). (Figura 18).

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com asma persistente grave, verificado no tempo zero (8,5) foi menor do que a das crianças controle normais (19; $p = 0,0074$, teste de Mann Whitney), sendo 11,0 aos 3 meses de tratamento e de 4,0 aos seis meses de tratamento, para a fagocitose testada utilizando-se $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. O tratamento não modificou o índice fagocitário dos neutrófilos neste grupo ($p = 0,45$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). A diminuição da mediana do índice fagocitário deveu-se ao menor envolvimento dos neutrófilos na fagocitose comparados as crianças controle

(15,0) antes do tratamento ($p = 0.0092$; teste Mann Whitney), sendo de 8,0 aos 3 meses de tratamento e de 3,0 aos seis meses de tratamento, respectivamente, ($p = 0,48$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 13), não havendo diferença entre a média de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos quando comparadas às crianças controle normais (1,31; 1,37; 1,33 e 1,44 respectivamente) ($p = 0,68$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 18).

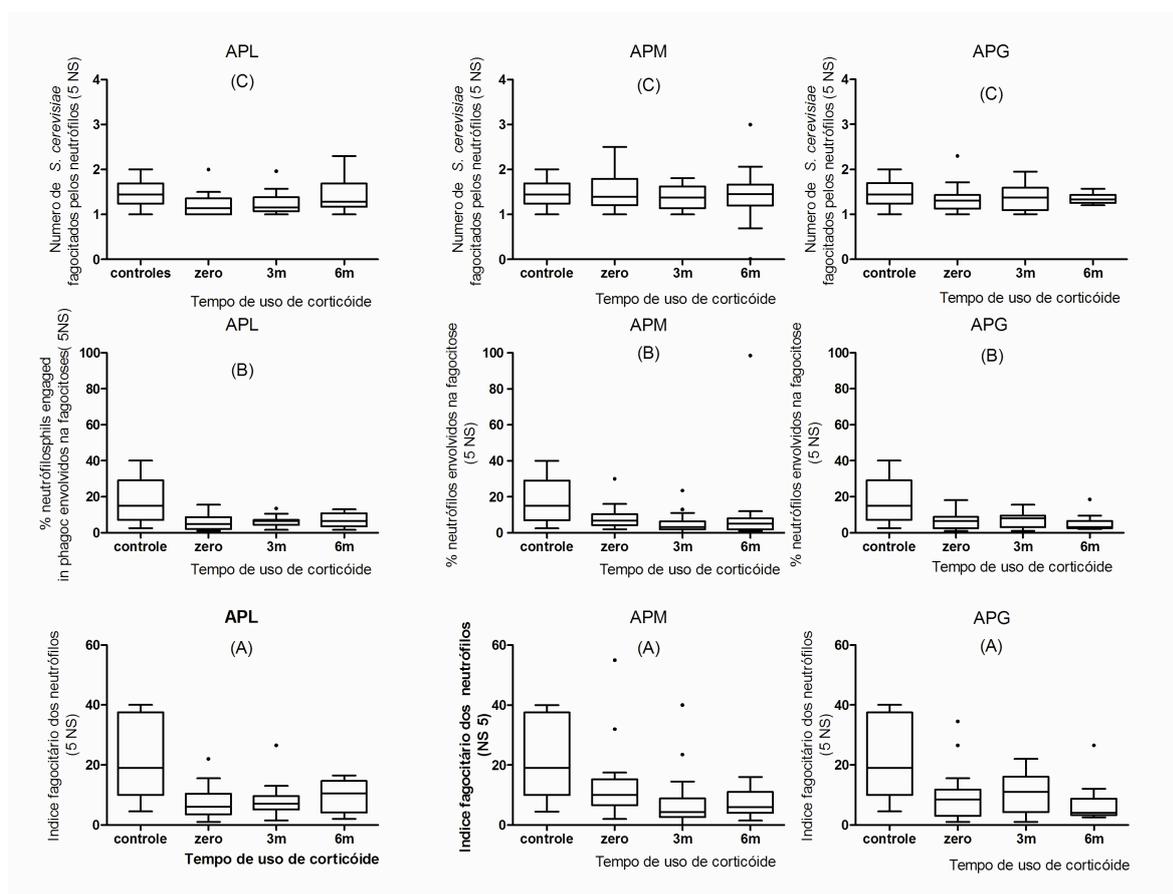


Figura 18. Índice fagocitário de neutrófilos (A), porcentagem de neutrófilos envolvidos na fagocitose (B), e Média de leveduras ingeridas por neutrófilos(C), in vitro, para *Saccharomyces cerevisiae* ($6,25 \times 10^4$) na presença de soro fetal bovino inativado, em indivíduos controles e com asma persistente leve, moderada e grave, no início e durante o tratamento com corticoide inalatório (tempos: zero, três, e seis meses). Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

Quando a fagocitose pelos neutrófilos foi testada utilizando $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, nas crianças com asma persistente leve, observou-se uma resposta semelhante em todos os tempos de tratamento quanto ao índice fagocitário e proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, que aumentaram aos 3 meses e diminuíram aos 6 meses de tratamento, embora sem significância estatística. Resposta diferente foi observada em relação a média de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos que diminuíram aos 3 meses e aumentaram aos 6 meses de tratamento com corticoide inalatório, embora sem

significância estatística. As crianças com asma persistente leve apresentaram, em todos os tempos de tratamento, a mediana do índice fagocitário significativamente menor do que a das crianças controles normais ($p=0.0004$, teste t) e o tratamento com o corticóide não modificou a capacidade fagocitária quando avaliadas até 6 meses após o tratamento comparadas as crianças controles normais (7,75; 9,5; 9,25 e 30,75, respectivamente) ($P=0.57$, ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls comparação entre os grupos) (Figura 14). A diminuição do IF foi devida ao menor envolvimento dos neutrófilos das crianças com asma persistente leve (6,25) na fagocitose comparados as crianças controle (28) ($p=0,0003$, teste t), não havendo diferença no número médio de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos comparados as crianças controles normais (1,23; 1,19; 1,42 e 1,52 respectivamente) ($p=0,30$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 19)

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos (9,25, 9,5 e 11,5) das crianças com asma persistente moderada, para a fagocitose testada utilizando-se $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, foi significativamente menor no início do tratamento do que a das crianças controles normais (30,75) ($p=0.0006$, teste t), e o tratamento com corticóide não modificou a capacidade fagocitária dos neutrófilos ($p=0,87$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Apesar dos valores menores das medianas da proporção dos neutrófilos na fagocitose das crianças com asma persistente moderada comparados as crianças controle normais (5,5; 6,0; 7,75 e 28,0 respectivamente), não se observou diferença estatística significativa ($p = 0,75$, Kruskal-Wallis, seguido estatística significativa pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), não havendo diferença no número médio de

leveduras fagocitadas comparados as crianças controle normais (1,34; 1,53; 1,37 e 1,52 respectivamente) ($p = 0,60$. Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 19)

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos (9,5, 6,0 e 6,5) das crianças com asma persistente grave, para a fagocitose testada utilizando-se $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, foi significativamente menor no início do tratamento do que a das crianças controles normais (30,75) ($p = 0.0007$, teste t), e o tratamento com corticóide não modificou a capacidade fagocitária dos neutrófilos ($p = 0,13$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunns para comparação entre os grupos). Esta diminuição deveu-se ao menor envolvimento dos neutrófilos na fagocitose das crianças com asma persistente grave (6,5) comparados as crianças controle normais (28,0) antes do tratamento ($p = 0.0004$; teste t), e o tratamento não modificou o envolvimento dos neutrófilos das crianças com asma persistente grave na fagocitose, cujas medianas foram iguais a 4,5 aos 3 meses e 4,75 aos 6 meses ($p = 0,41$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Não houve diferença no número médio de leveduras fagocitadas comparados as crianças controle normais (1,38; 1,41; 1,40 e 1,52 respectivamente) ($p=0,87$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 19).

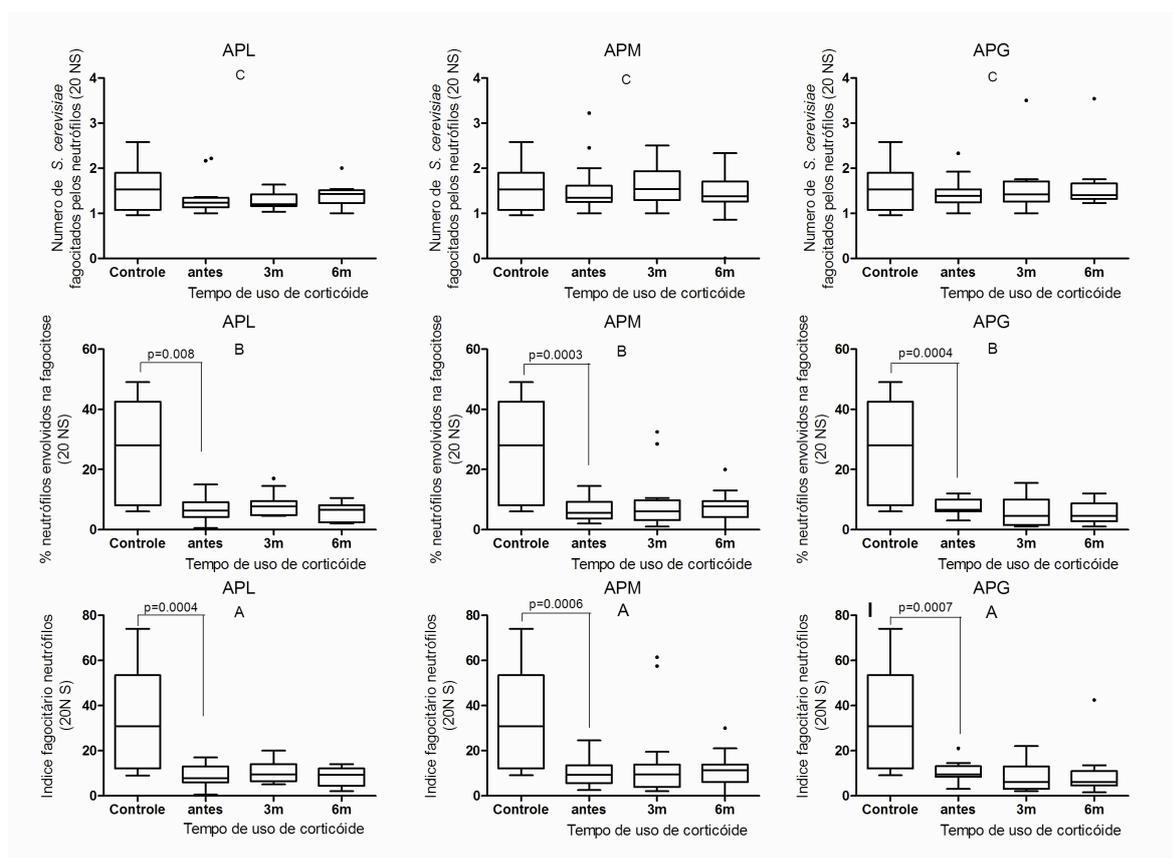


Figura 19. Índice fagocitário de neutrófilos (A), porcentagem de neutrófilos envolvidos na fagocitose (B), e Média de leveduras ingeridas por neutrófilos(C), in vitro, para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$), na presença de soro fetal bovino inativado, em indivíduos controles, e com asma persistente leve, moderada e grave no início e durante o tratamento com corticoide inalatório (tempos: zero, três, e seis meses. Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

6.3.2. Influência do tratamento com corticoide inalatório sobre a capacidade fagocitária de monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, na presença de soro fetal bovino inativado.

A capacidade fagocitária dos monócitos das crianças com asma persistente leve foi significativamente menor do que o das crianças normais. E, embora tenha havido aumento da capacidade fagocitária após 6 meses de tratamento com o corticoide inalatório, os valores da capacidade fagocitária ainda foram menores do

que a das crianças normais. A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente leve antes do início do tratamento com corticóide inalatório (6,5) foi significativamente menor do que a das crianças controle normais (29,50) ($p=0.0003$, Mann Whitney teste). Após o tratamento com o corticóide inalatório a mediana do IF manteve o mesmo valor de 6,5 aos 3 meses e aumentou para 11,0 aos 6 meses de acompanhamento ($p=0,09$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), quando a fagocitose foi testada utilizando $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizado por escavação. Esta diminuição deveu-se ao menor envolvimento dos monócitos na fagocitose das crianças com asma persistente leve (5,75) antes do tratamento com corticóide inalatório, comparados as crianças controle normais (19,25) ($p=0.0006$, Mann Whitney teste), no entanto, ao longo do tratamento as medianas da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose foram de 5,0 aos 3 meses e de 8,5 aos 6 meses ($p=0.21$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Houve uma tendência a diferença estatística entre as médias das leveduras fagocitadas pelos monócitos comparados às crianças controle normais (1,17; 1,23; 1,41 e 1,24, respectivamente) ($p=0,08$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). (Figuras 20).

A capacidade fagocitária dos monócitos das crianças com asma persistente moderada foi significativamente menor do que o das crianças normais. Observou-se um declínio da capacidade fagocitária aos 3 meses de tratamento com corticóide inalatório, seguido de um aumento após 6 meses de tratamento, no entanto, os valores da capacidade fagocitária ainda foram menores do que a das crianças normais, entretanto sem significância estatística. A mediana do índice

fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente moderada monócitos antes do tratamento com corticóide inalatório (11,25) foi significativamente menor do que a das crianças controle normais (29,50) ($p < 0,05$, Mann-Whitney teste). Observou-se, no entanto, com o tratamento com corticóide inalatório que a mediana do IF diminuiu para o valor de 8 aos 3 meses e aumentou para 11,25 aos 6 meses de acompanhamento, entretanto sem significância estatística ($p = 0,27$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), quando a fagocitose foi testada utilizando $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizada por escavação. Apesar dos valores menores das medianas da proporção dos monócitos das crianças com asma persistente moderada comparado aos das crianças controle normais (8,75; 5,0; 7,5 e 19,25 respectivamente), não houve diferença estatisticamente significativa após seis meses de tratamento com corticóide inalatório ($p = 0,24$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), o mesmo ocorrendo com as médias das leveduras fagocitadas pelos monócitos comparados às crianças controle normais (1,31; 1,40; 1,45 e 1,24, respectivamente) ($p = 0,72$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figuras 20).

A capacidade fagocitária dos monócitos das crianças com asma persistente grave foi significativamente menor do que o das crianças normais. Observou-se um aumento da capacidade fagocitária aos 3 meses de tratamento com corticóide inalatório, seguido de um declínio após 6 meses de tratamento, no entanto, os valores da capacidade fagocitária ainda foram menores do que a das crianças normais. A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente grave antes do tratamento com corticóide inalatório (6,5) foi

significativamente menor do que a das crianças controle normais (29,50) ($p=0.0001$, Mann-Whitney teste). Observou-se, com o tratamento com o corticóide inalatório que a mediana do IF aumentou para o valor de 9,5 aos 3 meses e diminuiu para 6,0 aos 6 meses de acompanhamento ($p=0,15$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), quando a fagocitose foi testada utilizando $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizada por escavação. Apesar dos valores menores das medianas da proporção de monócitos envolvidos com a fagocitose das crianças com asma persistente grave, quando comparado aos das crianças controle normais (4,5; 7,5; 4,0 e 19,25 respectivamente) não se observou diferença estatística significativa ($p=0.17$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) , o mesmo ocorrendo entre as médias das leveduras fagocitadas pelos monócitos comparados às crianças controle normais (1,35; 1,42; 1,52 e 1,24, respectivamente) ($p=0,25$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figuras 20).

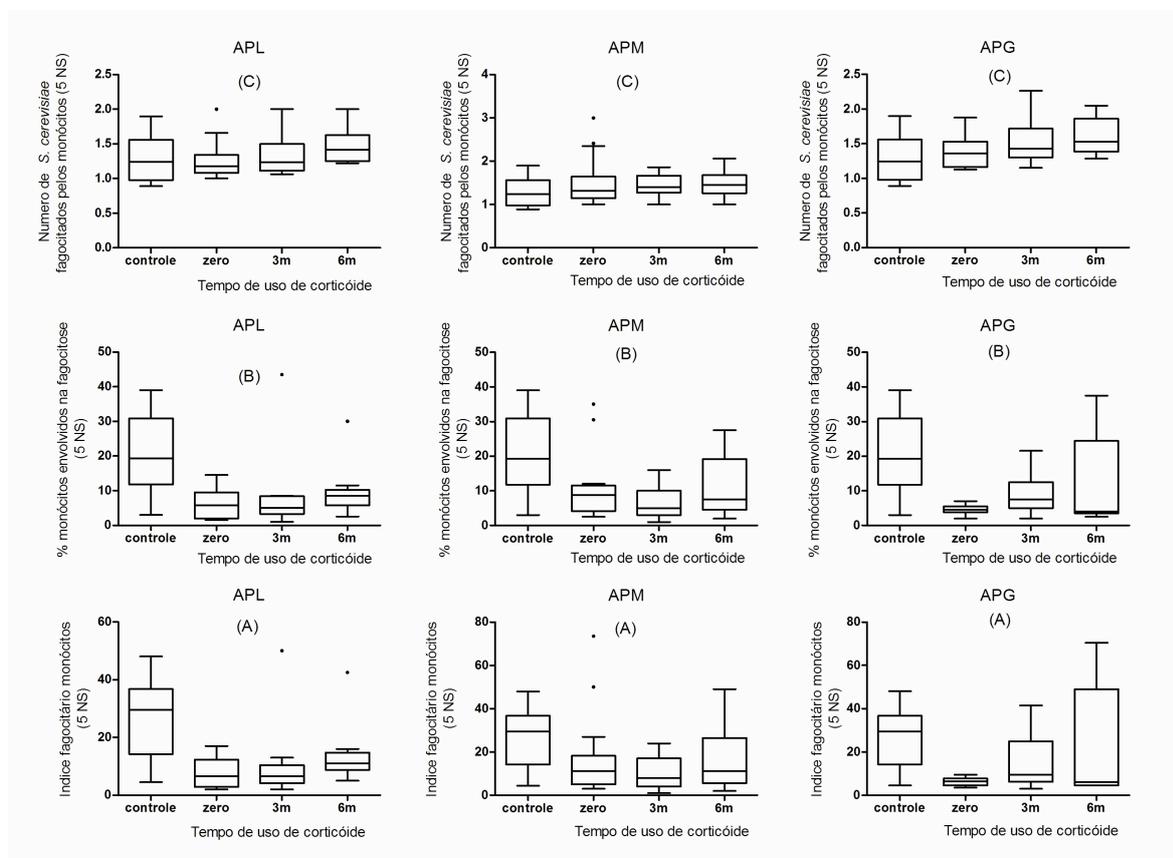


Figure 20. Índice fagocitário de monócitos (A), Porcentagem de monócitos envolvidos na fagocitose (B) e média de leveduras ingeridas por monócitos (C), in vitro, para *Saccharomyces cerevisiae* ($6,25 \times 10^4$), na presença de soro fetal bovino inativado, em indivíduos controles e com asma persistente leve, moderada e grave no início e durante o tratamento com corticóide inalatório (tempos: zero, três e seis meses). Os valores são expressos em mediana, quartis e mínimos e máximos.

Quando a fagocitose pelos monócitos foi testada utilizando $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, a capacidade fagocitária dos monócitos das crianças com asma persistente leve, moderada e grave, foi significativamente menor do que o das crianças normais. As crianças com asma persistente leve apresentaram a mediana do índice fagocitário dos monócitos antes do início do tratamento com corticóide inalatório (9,25) significativamente menor do que a das crianças controle normais (47,50) ($p=0,0014$, Mann-Whitney teste). Após o tratamento com o corticóide inalatório, a mediana do IF foi de 8,25 aos 3 meses e 8,50 aos 6 meses de acompanhamento ($p=0,94$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). A diminuição do IF foi devida ao menor número médio de leveduras fagocitadas pelos monócitos das crianças com asma persistente leve quando comparados às crianças controles normais (1,21; 1,32; 1,50 e 1,73 respectivamente) ($p = 0,06$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), não havendo diferença estatística na proporção de monócitos envolvidos na fagocitose das crianças com asma persistente leve quando comparados às crianças controles normais (8,25, 6,75, 6,0 e 28,0, respectivamente) ($p = 0,88$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). (Figura 21).

A capacidade fagocitária dos monócitos das crianças com asma persistente moderada foi significativamente menor do que o das crianças normais. No entanto, apesar de se observar um aumento da capacidade fagocitária aos 3 meses de tratamento, aos 6 meses houve um declínio para valores similares ao início do tratamento com corticóide inalatório, entretanto sem significância estatística. A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma

(9,50) antes do tratamento foi significativamente menor do que a das crianças controle normais (47,50) ($p=0.016$, teste de Mann-Whitney). Observou-se, no entanto, com o tratamento com o corticóide inalatório que a mediana do IF aumentou para o valor de 13,5 aos 3 meses e declinou para 10,5 aos 6 meses de acompanhamento, porém sem significância estatística ($p=0,33$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 17). Não houve diferença significativa da porcentagem de envolvimento dos monócitos na fagocitose comparados as crianças controles normais (8,5; 8,0; 7,5 e 28 respectivamente) ($p=0,75$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), não havendo diferença estatisticamente significativa no número médio de leveduras fagocitadas pelos monócitos comparados as crianças controles normais (1,38; 1,57; 1,51 e 1,73) ($p=0,22$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 21).

De forma similar, a capacidade fagocitária dos monócitos das crianças com asma persistente grave foi significativamente menor do que o das crianças normais. No entanto, apesar de se observar um aumento da capacidade fagocitária aos 3 meses de tratamento, aos 6 meses houve um declínio para valores similares ao início do tratamento com corticóide inalatório. A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma grave (11,0) antes do tratamento foi significativamente menor do que a das crianças controle normais (47,50) ($p<0,05$, Mann-Whitney teste). Observou-se, no entanto, com o tratamento com o corticóide inalatório que a mediana do IF aumentou para o valor de 15,0 aos 3 meses e declinou para 8,75 aos 6 meses de acompanhamento, sem significância estatística ($p=0,75$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 17). Não havendo diferença

estatisticamente significativa na proporção de monócitos envolvidos na fagocitose das crianças com asma grave comparado as crianças controles normais (7,25; 11,5; 7,0 e 28 respectivamente) ($p=0,82$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), bem como no número médio de leveduras fagocitadas pelos monócitos comparados as crianças controles normais (1,46; 1,62; 1,42 e 1,73) ($p=0,48$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 21).

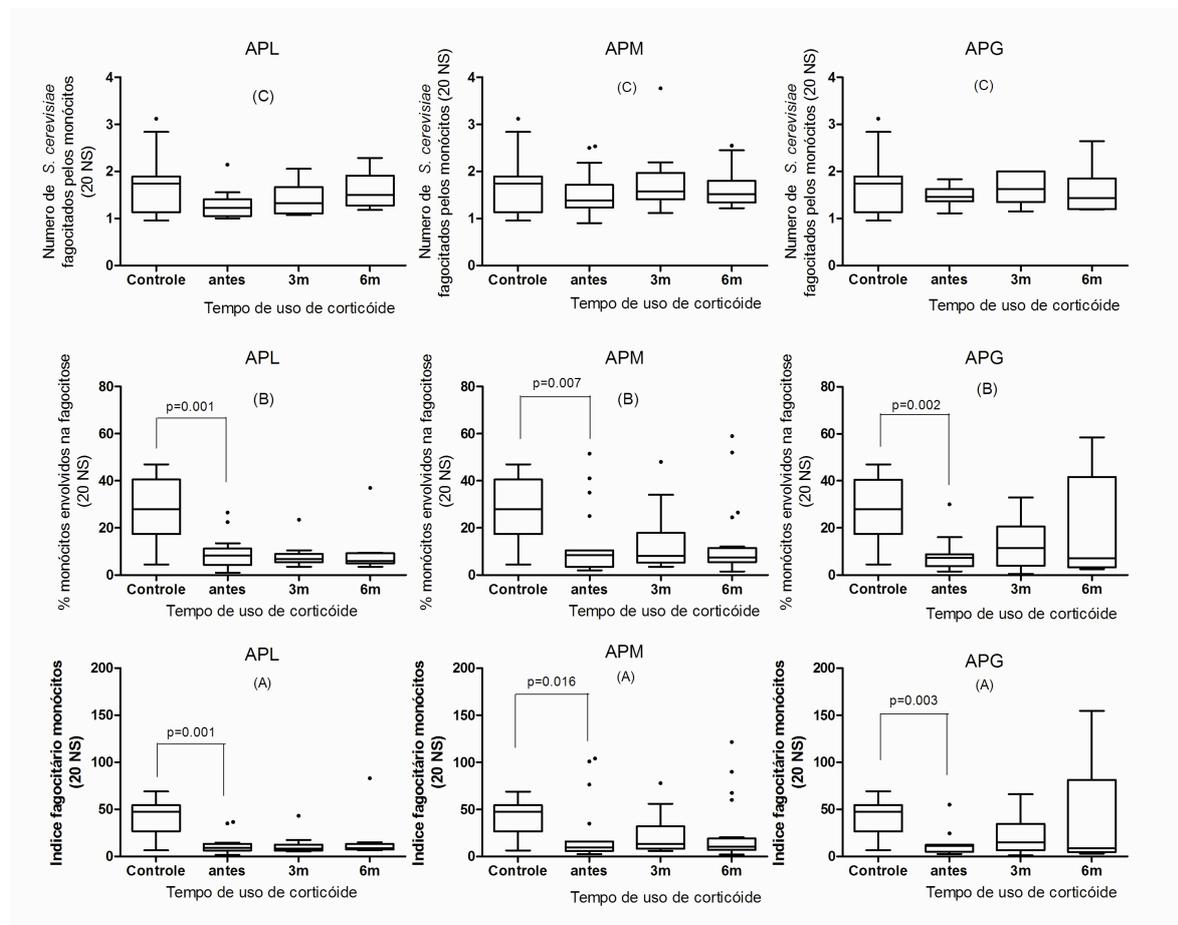


Figura 21. Índice fagocitário de monócitos (A), porcentagem de monócitos envolvidos na fagocitose (B), média de leveduras ingeridas por monócitos (C) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$) na presença de soro fetal bovino inativado, em indivíduos controles e com asma persistente leve, moderada e grave, no início e durante o tratamento com corticoide inalatório (tempos: zero, três, e seis meses). Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

6.4. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CORTICÓIDE INALATÓRIO POR 6 MESES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ASMA PERSISTENTE LEVE, MODERADA OU GRAVE, PELOS RECEPTORES PARA OPSONINAS.

6.4.1 Influência do tratamento com corticóide inalatório sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos de crianças asmáticas, avaliada pelos receptores para opsoninas.

Quando a fagocitose foi testada utilizando-se $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae*, por escavação, o índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com asma persistente leve não apresentou diferença estatística significativa quando comparado as crianças controle normais (110,3; 113,0; 109,0 e 106,5 respectivamente) ($p=0,82$, Kruskal-wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Resultados similares foram encontrados em relação à proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose comparada as crianças controle normais (56,0; 54,75; 54,50 e 57,0 respectivamente) ($p=0,78$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), bem como ao número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos comparada as crianças controle normais (2,048; 2,127; 2,048 e 2.048 respectivamente) ($p = 0,53$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 22).

O índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com asma persistente moderada não apresentou diferença estatisticamente significativa (114,0; 132,0; 135,0 e 106,5 respectivamente) ($p = 0.67$; Kruskal-wallis, seguido pelo método de

Dunn para comparação entre os grupos). Resultados similares foram encontrados em relação à proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose comparada as crianças controle normais (55,5; 69,5; 65,0 e 57,0 respectivamente) ($p = 0,28$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), bem como ao número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos comparada as crianças controle normais (2,06; 2,20; 2,12 e 2,048 respectivamente) ($p = 0,57$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 22).

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com asma persistente grave não apresentou diferença estatística significativa antes do tratamento com corticóide inalatório (111,3; 119,5; 111,5; e 106,5 respectivamente) quando comparada a das crianças controle normais ($p = 0,74$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) quando a fagocitose foi testada utilizando-se $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. O mesmo foi observado com o a mediana da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose das crianças com asma persistente grave (55,0; 58,50; 56,0 e 57,00, respectivamente) ($p = 0,76$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), e com o número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos, quando comparada às crianças controle normais (2,10; 2,04; 2,05 e 3,16, respectivamente) (0,001; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 22).

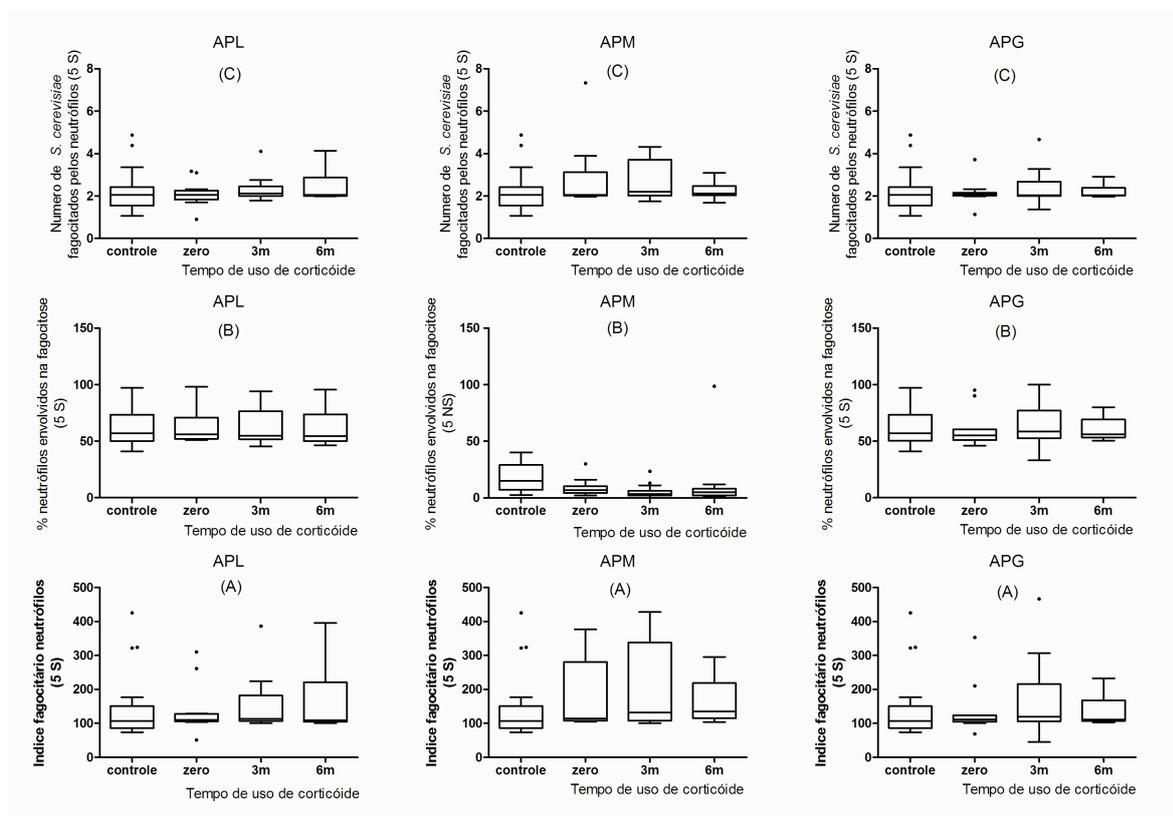


Figura 22. Índice fagocitário de neutrófilos (A), porcentagem de neutrófilos envolvidos na fagocitose (B), e média de leveduras ingeridas por neutrófilos (C), *in vitro*, para *Saccharomyces cerevisiae* ($6,25 \times 10^4$), na presença de soro fresco do doador, em indivíduos controles e com asma persistente leve, moderada ou grave, no início e durante o tratamento com corticóide inalatório (tempos: zero, três, e seis meses). Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

Quando a fagocitose foi testada utilizando-se $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, a capacidade fagocitária dos neutrófilos das crianças com asma persistente leve foi significativamente menor do que a das crianças normais. A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com asma persistente leve antes do tratamento com corticóide inalatório (113,0) foi significativamente menor do que a das crianças controle normais (253,5) ($p =$

0.0044; teste de Mann-Whitney). Observou-se com o tratamento com corticóide inalatório que a mediana do IF diminuiu para o valor de 110,5 aos 3 meses e aumentou para 113,3 aos 6 meses de acompanhamento, porém sem significância estatística ($p = 0,90$, Kruskal-wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). E, tanto para a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose das crianças com asma persistente leve comparada as crianças controle normais (55,0; 57,0; 57,25 e 73,00, respectivamente) ($p = 0,30$, Kruskal-wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), quanto para o número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos comparada as crianças controle normais (2,16; 2,07; 2,0 e 2,6 respectivamente) ($p = 0,29$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) não houve significância estatística (Figura 23).

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com asma persistente moderada antes do tratamento com corticóide inalatório (118,3) foi significativamente menor do que a das crianças controle normais (253,5) ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) quando a fagocitose foi testada utilizando-se $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae*, por escavação. Observou-se com o tratamento com corticóide inalatório que a mediana aumentou para 235,8 aos 3 meses e diminuiu para 119,0 aos 6 meses, porém sem significância estatística ($p = 0,54$. Kruskal-wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Resultados similares foram encontrados em relação à proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose comparada as crianças controle normais (57,75; 75,0; 60,50 e 81,0 respectivamente) ($p = 0,22$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), bem como ao número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos, comparada as crianças controle normais (2,14;

2,84; 2,11 e 3,16 respectivamente) ($p = 0.86$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 23).

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com asma persistente grave antes do tratamento com corticóide inalatório (111,5) foi significativamente menor do que a das crianças controle normais (235,5) ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) quando a fagocitose foi testada utilizando-se $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Observou-se que a mediana do IF aumentou para o valor de 116,3 aos 3 meses e para 114,5 aos 6 meses de tratamento, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,76$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Resultados similares foram observados em relação à proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, comparada às crianças controle normais (54,50; 56,00; 56,5 e 81,00, respectivamente) ($p = 0,48$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), e quanto ao menor número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos, comparada às crianças controle normais (2,08; 2,04; 2,05 e 2,66, respectivamente) ($0,26$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 23).

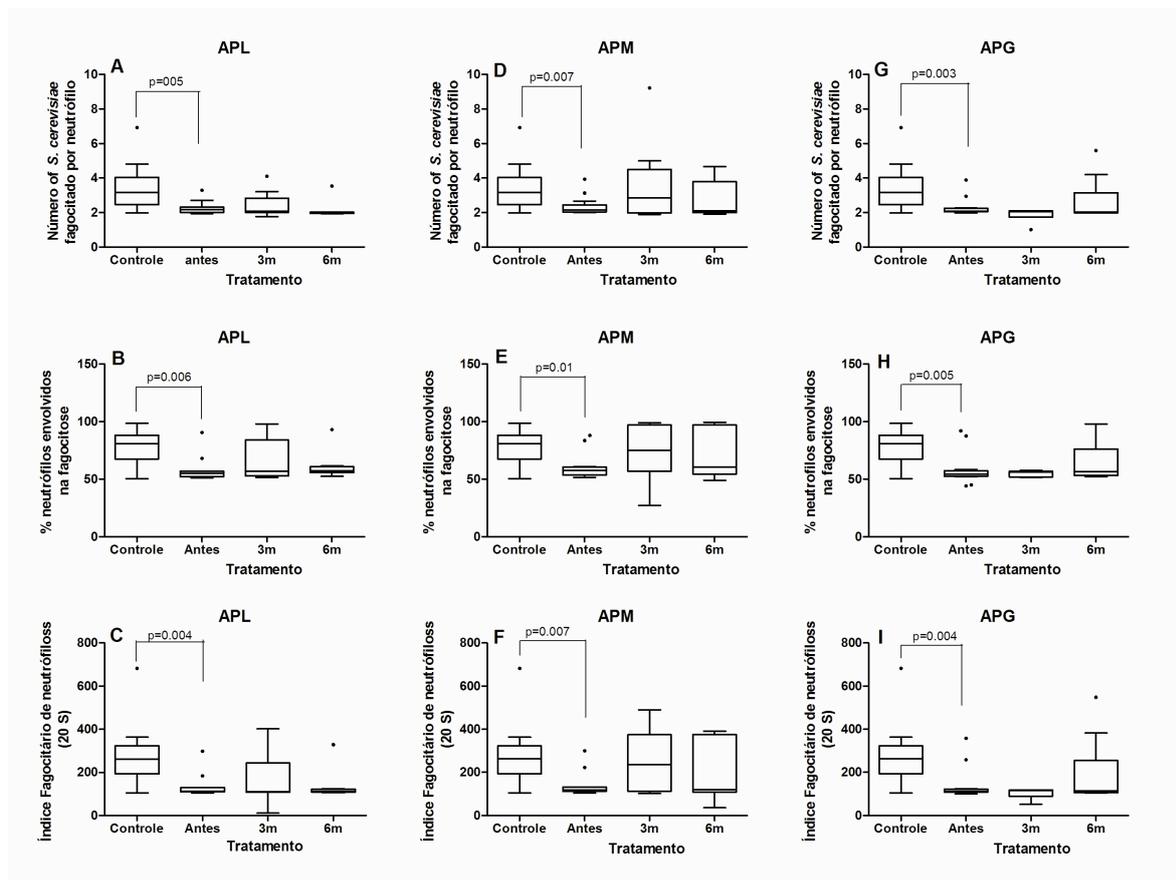


Figura 23. Índice fagocitário de neutrófilos (A), porcentagem de neutrófilos envolvidos na fagocitose (B), média de leveduras ingeridas por neutrófilos (C), in vitro, para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$), na presença de soro fresco do doador, em indivíduos controles e com asma persistente leve no início e durante o tratamento com corticóide inalatório (tempos: zero, três, e seis meses). Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

6.4.2. Influência do tratamento com corticóide inalatório sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de crianças asmáticas, avaliada pelos receptores para opsoninas.

A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente leve não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada a das crianças controle normais (107,5; 114,0; 114,8 e 104,5 respectivamente) ($p = 0,32$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) utilizando-se $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Resultados similares foram observados em relação a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (54,0; 57,5; 56,26; e 53,50 respectivamente) comparada às crianças controle normais ($p = 0,29$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), e ao número de leveduras fagocitadas pelos monócitos, comparada às crianças controle normais (2,12; 2,06; 2,06 e 2,0, respectivamente) (0,84 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 24).

A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente moderada não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada a das crianças controle normais (114,3; 115,8; 120,0 e 104,5 respectivamente) ($p=0,62$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Resultados similares foram observados em relação a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose (56,7; 57,5; 60,5; e 53,50 respectivamente) comparada às crianças controle normais ($p = 0,37$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), e ao número de leveduras fagocitadas pelos monócitos, comparada às crianças controle normais (2,06; 2,20; 2,06 e 2,0, respectivamente) ($P = 0,52$; Kruskal-

Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 24).

A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente grave não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada a das crianças controle normais (111,8; 119,5; 112,0 e 104,5 respectivamente) ($p = 0.10$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), bem como a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose (55,5; 59,5; 56,25; e 53,50 respectivamente), comparadas às crianças controle normais ($p=0.08$ Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), e o número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos, comparadas às crianças controle normais (2,06; 2,03; 2,0 e 2,0, respectivamente) ($P = 0,49$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 24).

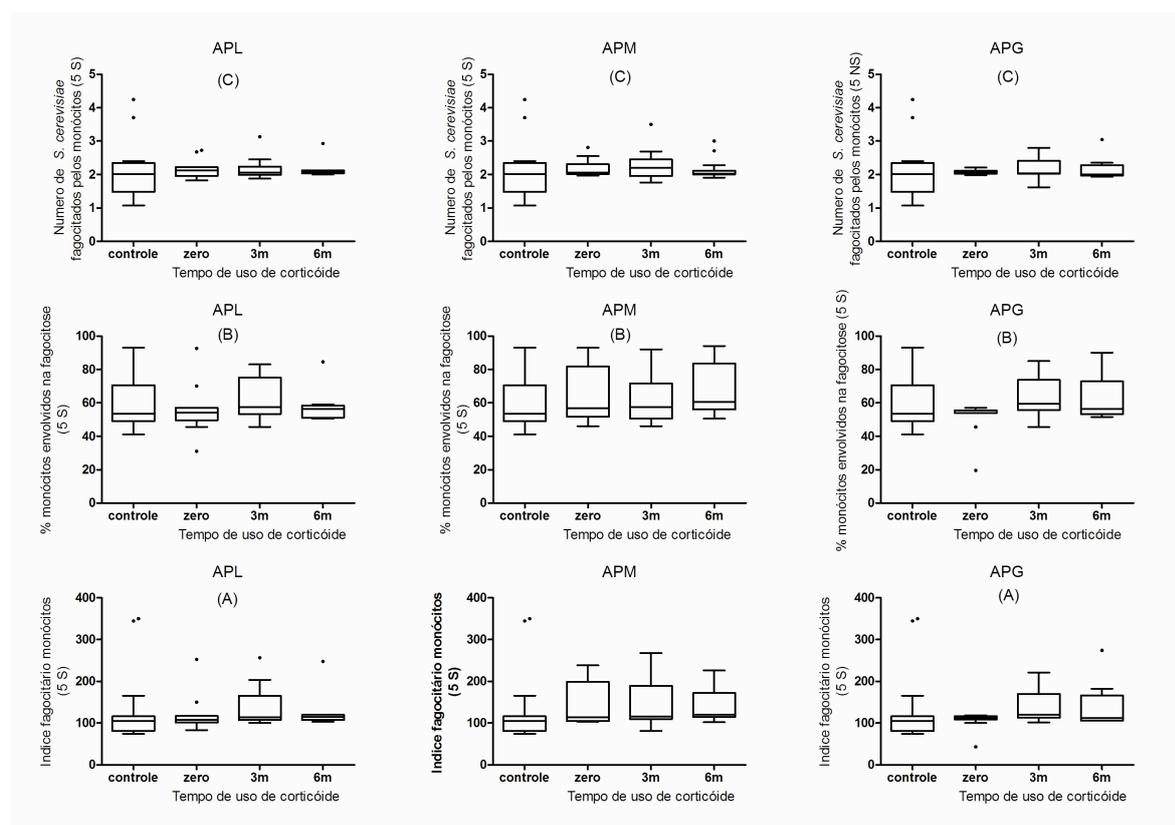


Figura 24. Índice fagocitário de monócitos (A), porcentagem de monócitos envolvidos na fagocitose (B), média de leveduras ingeridas por monócitos (C), *in vitro*, para *Saccharomyces cerevisiae* ($6,25 \times 10^4$), na presença de soro fresco do doador, em indivíduos controles e com asma persistente leve, moderada e grave, no início e durante o tratamento com corticóide inalatório (tempos: zero, três, e seis meses). Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

A capacidade fagocitária dos monócitos das crianças com asma persistente leve foi significativamente menor do que a das crianças normais. A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente leve antes do tratamento com corticóide inalatório (109,0) apresentou diferença estatística comparada a das crianças controle normais (235,5) ($p = 0,03$, teste de Mann-Whitney) quando a fagocitose foi testada utilizando-se $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Observou-se que a mediana do IF aumentou para o valor de 111 aos 3 meses e 111,8 aos 6 meses de tratamento com corticóide inalatório ($p = 0,81$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para

comparação entre os grupos), no entanto, não foi estatisticamente significativa (Figura 21). O mesmo foi observado quanto a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose nas crianças com asma (54,50; 55,50; 56,0 e 73,0 respectivamente) comparada às crianças controle normais ($p = 0,80$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), e quanto ao número de leveduras fagocitadas pelos monócitos, comparada às crianças controle normais (2,11; 2,05; 2,02 e 2,66, respectivamente) ($p = 0,49$; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 25).

A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente moderada não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada a das crianças controle normais (118,5; 121,5; 116,0 e 235,5 respectivamente) ($p = 0,88$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). O mesmo foi observado para proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (56,5; 52,5; 58,0; e 73,0 respectivamente) comparada às crianças controle normais ($p=0,75$ Kruskal-Wallis/Dunn's), e o número de leveduras fagocitadas pelos monócitos, comparada às crianças controle normais (2,08; 2,29; 2,09 e 2,66, respectivamente) ($p = 0,48$ Kruskal-Wallis/Dunn's) (Figura 25).

A mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com asma persistente grave não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada a das crianças controle normais (110,5; 110,8; 116,5 e 235,5 respectivamente) ($p = 0,37$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Resultados similares foram observados em relação a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (54,5; 55,0; 57,5; e 73,0 respectivamente) comparada às crianças controle normais ($p = 0,41$ Kruskal-

Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), e ao número de leveduras fagocitadas pelos neutrófilos, comparada às crianças controle normais (2,07; 2,05; 2,02 e 2,66, respectivamente) (0.22 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 25).

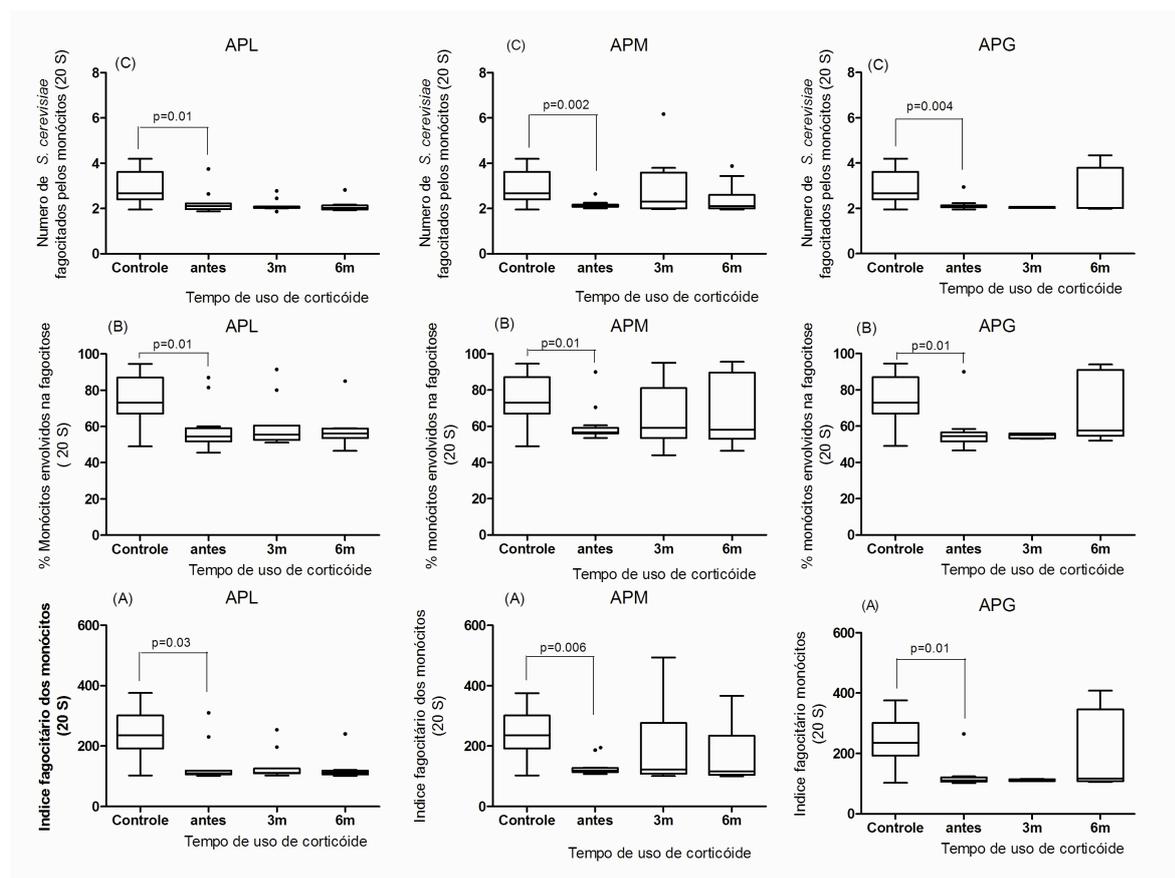


Figura 25. Índice fagocitário de monócitos (A), porcentagem de monócitos envolvidos na fagocitose (B), média de leveduras ingeridas por monócitos (C), in vitro, para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$), na presença de soro fresco do doador, em indivíduos controle, e com asma persistente leve, moderada e grave, no início e durante o tratamento com corticóide inalatório (tempos: zero, três, e seis meses). Os valores são expressos em mediana, quartis, mínimos e máximos.

6.5. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CORTICÓIDE INALATÓRIO POR 6 MESES, SOBRE A PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO PELOS FAGÓCITOS DE CRIANÇAS COM ASMA PERSISTENTE, PELO TESTE DO *NITROBLUE TETRAZOLIUM* (NBT).

A porcentagem de redução de NBT basal foi menor nas crianças com asma persistente leve (80,5%) antes do tratamento comparadas as crianças controle normais (88,75%) ($p=0.01$, Mann Whitney teste). E o tratamento por seis meses aumentou significativamente a porcentagem de redução de NBT basal ($p = 0.04$, Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn para comparação entre os grupos).

Quando analisada a porcentagem de redução de NBT estimulado, as crianças com asma persistente leve apresentaram uma menor mediana da (94,0%) antes do tratamento, comparadas as crianças controle normais (98,5%) ($p = 0.02$, teste de Mann Whitney). E o tratamento por seis meses diminuiu significativamente a porcentagem de redução de NBT basal ($p=0.0022$, Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 26).

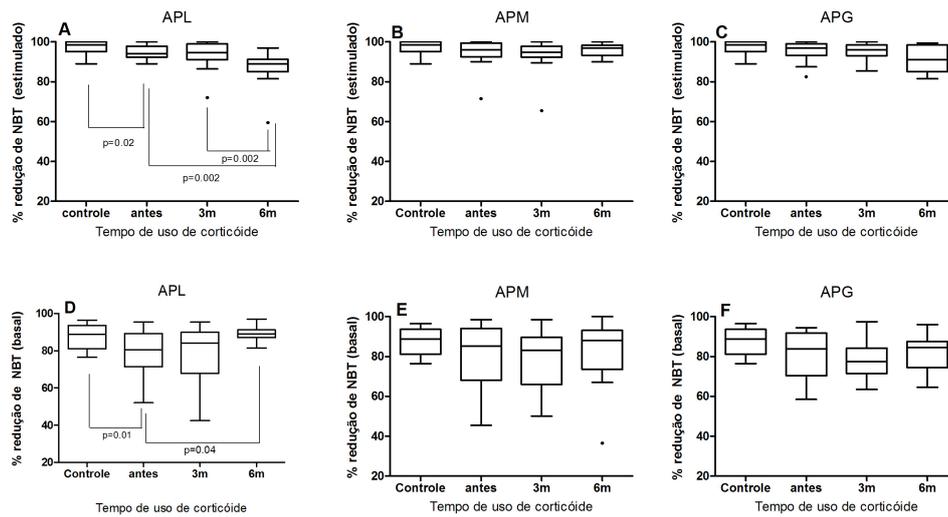


Figura 26. Comparação da produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos expressadas pelo percentual de redução de nitro blue tetrazolim entre os grupos de asma persistente leve, moderada e grave e crianças controle normais. Os dados estão expressos em mediana, quartis e extremos. O outlier está indicado. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar o controle e os pacientes asmáticos antes do tratamento. Apenas o grupo com asma persistente leve foi menor que o grupo controle (A and D) (antes<controle). O teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's, foi usado para comparar os grupos. Apenas o grupo com asma persistente leve mostrou uma diferença significativa. Entretanto, 6m>antes para basal, enquanto 3 e 6 m< antes com estímulo.

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi um estudo prospectivo que avaliou pela primeira vez a influência do tratamento da asma com CI por 3 e 6 meses sobre as funções fagocitárias de neutrófilos e monócitos e sobre a ativação de eosinófilos.

No presente trabalho, os eosinófilos no sangue periférico de crianças e adolescentes com asma, antes, aos 3 e aos 6 meses de tratamento com CI, foram avaliados quanto ao estado de ativação segundo parâmetros morfológicos após aderência à lâmina. Observamos que os eosinófilos normais, não ativados, encontravam-se em menor porcentagem nas crianças com asma antes do tratamento, e que a porcentagem aumentou após seis meses de uso de CI, exceto nas crianças com asma persistente grave.

Dentre estas alterações morfológicas quantificadas verificamos que para as crianças com asma persistente leve e moderada, todos os parâmetros encontram-se elevados em relação às crianças normais, exceto a emissão de grânulos em grande quantidade e a presença de vacúolos, e dos parâmetros alterados, todos demoram 6 meses para diminuir significativamente após o tratamento com o CI, exceto a emissão de pseudópodes localizados, cuja diminuição já foi observada aos 3 meses de tratamento.

Para as crianças com APG, somente a proporção de eosinófilos normais estavam diminuídos e a emissão de grânulos em pequena quantidade estava aumentada em relação às crianças normais, e somente a emissão de grânulos em grande quantidade e o contato entre células mostrou parâmetros de melhora com o tratamento, mostrando que em seis meses de tratamento com o CI estas alterações diminuíram significativamente nas crianças com asma persistente leve e moderada, mas não nas crianças com asma grave. Estudos têm sido conduzidos com indivíduos com asma grave, demonstrando que este grupo de

pacientes apresenta diferentes fenótipos que necessitam de investigação mais minuciosa (Gibeon et al., 2012). Outro achado importante foi que as crianças com asma intermitente foram diferentes das crianças controle normais apenas em relação à maior frequência de eosinófilos espiroides que estas. A inflamação crônica de vias aéreas é reconhecida como um importante componente de todas as formas da doença, o que faz do corticosteróide inalatório a base de seu tratamento (Sawicki et al., 2013). E nas crianças com asma persistente grave, antes do tratamento, a alteração morfológica significativa foi a emissão de grânulos em pequena quantidade, comparada as crianças saudáveis, e não houve modificação com o tratamento. Um achado relevante, neste grupo, foi o aumento da proporção de emissão de grânulos em grande quantidade aos 3 meses de tratamento com CI. Nossos dados estão de acordo com Muniz-Junqueira et al. (2013) que mostraram porcentagem aumentada de eosinófilos com alterações morfológicas em crianças com asma, tanto na crise, quanto em crianças assintomáticas no período intercrise, quando comparadas com crianças controle normais.

O eosinófilo parece desempenhar um importante papel na fisiopatologia da asma grave. Divergência no número de eosinófilos em indivíduos com asma grave também foi observado por Wenzel et al(1999) em um estudo que avaliou 34 pacientes com asma grave por biópsia endobrônquica. Eles identificaram um subgrupo de 20 pacientes que apresentavam número de eosinófilos situado dois desvios padrão acima da média de controles normais, enquanto os demais 14 pacientes mostraram o número de eosinófilos dentro do limite da normalidade. Nesse mesmo grupo de 20 pacientes, observaram aumento do espessamento da

membrana brônquica, aumento tecidual de linfócitos, macrófagos e neutrófilos e uma maior ocorrência de asma fatal. O mesmo estudo mostrou aumento da taxa de TGF- β nas células da membrana submucosa dos pacientes com número de eosinófilos elevados (Wenzel et al., 1999).

O nosso estudo foi importante não somente por demonstrar que as alterações morfológicas dos eosinófilos ocorreram com maior freqüência nas crianças com asma do que nas crianças saudáveis, como também, pelo dimensionamento destas alterações de acordo com as categorias de gravidade da asma, e a relação com os períodos pré e pós-tratamento. Observamos que após seis meses de tratamento houve diminuição das alterações morfológicas dos eosinófilos características da ativação destas células no grupo das crianças com asma persistente leve e moderada, bem como, um aumento da porcentagem de eosinófilos com aspecto normal, não ativados.

A asma é uma doença que está associada à ativação dos eosinófilos. Eles são células originárias da medula óssea e após a maturação seguem para a corrente sanguínea, onde se apresentam funcionalmente ativados ou em repouso (Kita, 2011), dependendo dos estímulos a que estejam submetidos (Erjefalt et al., 2000). As proteínas básicas específicas dos eosinófilos são armazenadas como grânulos secundários: a proteína básica maior (MPB), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) (Gundel et al., 1991). E os eosinófilos quando ativados liberam os grânulos protéicos e enzimas tóxicas, sendo observadas alterações morfológicas específicas durante o processo de ativação (Pronk-Admiraal et al., 2002). Os grânulos são libertados pela desgranulação fragmentada regulada, por exocitose clássica, quando os grânulos libertam seus conteúdos ao se fundirem

com a membrana plasmática, e por citólise, quando após ruptura da membrana plasmática os grânulos são libertados extracelularmente (Erjefalt et al., 2000; Shamri et al., 2011). Reconhece-se a desgranulação destas células, pelo número aumentado de vacúolos no citoplasma. Os eosinófilos ativados eliminam proteínas altamente citotóxicas, tais como a proteína eosinofílica catiônica e a proteína eosinofílica X (Vemge et al., 1987).

Os eosinófilos desgranulados são reconhecidos na corrente sanguínea (Dvorak et al., 1991), bem como os eosinófilos com aspecto celular de menor densidade, ou os eosinófilos hipodensos (Peters et al., 1988). No entanto, mais importante do que a presença do eosinófilo na inflamação, é a quantidade de eosinófilos ativados e suas características, como a desgranulação ou a densidade celular (Kuo et al. 1994). Erjefalt et al. (1998) avaliaram os eosinófilos de pólipos nasais e concluíram que a citólise é um dos mecanismos mais importantes de ativação do eosinófilo, e que está presente na mucosa das vias aéreas, além disto, a citólise pode ocorrer mesmo com pouca desgranulação.

Kuo et al. (1994) conduziu um estudo com 27 indivíduos asmáticos para correlacionar o número de eosinófilos hipodensos do sangue periférico com a gravidade da doença e o efeito do tratamento com CI. Encontrou uma forte relação com a severidade da doença e a hiperresponsividade brônquica, e observou que a porcentagem de eosinófilos hipodensos diminuiu com o tratamento, bem como o número total de eosinófilos, apesar da correlação fraca entre eles. Outros autores, no entanto, têm demonstrado uma forte correlação dos eosinófilos hipodensos com os eosinófilos totais circulantes (Fukuda et al., 1985).

Metodologicamente vale ressaltar, que o método utilizado no nosso estudo, no qual fizemos a avaliação dos eosinófilos após aderência em lâmina, permite

analisar o estado de ativação pelas características morfológicas da célula obtida ainda no sangue periférico, que se considerando ser a asma uma doença sistêmica, pode refletir o estado de ativação dos eosinófilos no sítio pulmonar (Muniz-Junqueira, et al. 2013).

Leckie et al. (2000) avaliaram o número de eosinófilos no sangue periférico, no escarro e no lavado broncoalveolar, e mostraram que nos indivíduos com asma eosinofílica os eosinófilos estão aumentados no sangue, no escarro e no lavado brônquico. Bousquet et al. (1990) estudaram em 43 indivíduos adultos com asma e 10 controles o número de eosinófilos no sangue periférico e a proteína catiônica eosinofílica no lavado broncoalveolar. Eles demonstraram que tanto o número de eosinófilos no sangue periférico, quanto o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar estavam expressivamente aumentados nos indivíduos com asma comparados aos indivíduos controles, além de se correlacionarem com a severidade da asma.

Com o intuito de verificar a acurácia de instrumentos de avaliação da inflamação, Pizzichini et al. (1996) avaliou 19 indivíduos com asma que tinham aumentada proporção de eosinófilos tanto no escarro como no sangue periférico e níveis aumentados da proteína eosinofílica catiônica no escarro, comparados a 20 indivíduos controle. E concluíram que a melhor acurácia foi obtida com a análise dos eosinófilos no escarro induzido.

Nossos dados mostraram também que o número de eosinófilos do sangue periférico foi significativamente maior nas crianças asmáticas antes do tratamento quando comparadas as crianças controles. No entanto, não houve diferença significativa do número de eosinófilos no sangue periférico com o tratamento com

CI, para nenhuma das classificações da asma, quando comparadas com as crianças controle normais.

Malerba et al. (2008) estudou 14 indivíduos com asma persistente leve e moderada e avaliou o número de eosinófilos no escarro induzido aos 3, 6 e 12 meses de tratamento com CI, e verificou que somente após seis meses de tratamento com CI houve uma diminuição do número de eosinófilos no escarro induzido. Nossos dados mostraram que em 6 meses de tratamento com CI houve diminuição significativa da proporção de alterações morfológicas do eosinófilos características de ativação nas crianças com asma persistente leve (espraiamento / emissão de grânulos em pequena e moderada quantidade / emissão de pseudópodes localizados / eosinófilos com contato entre células e degeneração celular), asma persistente moderada (espraiamento / emissão de grânulos em pequena e moderada quantidade / emissão de pseudópodes localizados / eosinófilos com degeneração celular) e asma persistente grave (emissão de grânulos em grande quantidade / eosinófilos com contato entre células).

Alguns estudos têm avaliado os eosinófilos juntamente com a função pulmonar com o objetivo de associar a função pulmonar com a inflamação. Jatakanon et al. (2000) avaliaram o número de eosinófilos e a função pulmonar em 15 indivíduos com asma, e observaram um aumento dos eosinófilos, deterioração da função pulmonar e aumento das exacerbações pela doença após a suspensão do CI. Zimmerman et al. (2006) avaliaram o número de eosinófilos e a proteína catiônica eosinofílica (ECP) no sangue periférico antes e após tratamento com corticóide inalatório, monitorando com a função pulmonar, e não encontrou correlação do número de eosinófilos com a severidade da asma e o

tratamento, mas demonstrou que a ECP se correlacionava com alterações na função pulmonar.

No nosso trabalho, avaliamos também a função pulmonar pelo pico de fluxo expiratório, e encontramos diferença estatisticamente significativa antes do tratamento com CI apenas para as crianças com asma persistente moderada e grave, e após o tratamento apenas para as crianças com asma persistente leve e moderada. Isto demonstrou que a função pulmonar não atingiu a normalidade com seis meses de tratamento nas crianças com asma persistente grave. Além disso, nós também avaliamos o controle clínico pelo ACT e encontramos diferença estatisticamente significativa aos seis meses de tratamento com CI em comparação ao período antes do tratamento, para as crianças com asma persistente leve e moderada, enquanto as crianças com asma persistente grave ainda não tinham obtido controle clínico. Chan et al. (2009) avaliaram 45 crianças com asma durante dois anos pelo ACT e o pico de fluxo expiratório, e observaram que eles dois métodos são instrumentos independentes de avaliação do controle da asma. No entanto, há de ressaltar que o ACT não avalia função pulmonar, e por este motivo ele não deve ser usado isoladamente na avaliação do controle da asma (Peroni et al., 2008). Tais observações reforçam a necessidade de que todo paciente com asma deva ser acompanhado por meio de avaliações seriadas do controle clínico e funcional, como também, deveria ser avaliado o controle inflamatório. Nossos dados contribuíram para acrescentar mais um parâmetro objetivo para avaliação da resposta ao tratamento com o CI de crianças com asma, e mostraram que o tratamento por 6 meses ainda é insuficiente para obter controle laboratorial se as crianças forem portadoras da forma grave da doença, entretanto, este tempo foi suficiente para mostrar melhora dos parâmetros de

ativação dos eosinófilos para as crianças com as formas leve e moderada da doença.

Ser por um lado, o controle total da doença promove uma melhoria na qualidade de vida do indivíduo com asma, por outro, a doença não controlada, aumenta a ocorrência de exacerbações, que podem ocasionar freqüentes internações e idas ao pronto socorro.

Além disto, tem sido demonstrado que o indivíduo com asma apresenta frequentemente infecção de vias aéreas durante as exacerbações pela doença. No entanto, os mecanismos associados com as infecções do trato respiratório no indivíduo com asma ainda carece de esclarecimento.

Rantala et al. (2013) avaliaram 1008 adultos atópicos e não atópicos e concluiu que os primeiros tinham mais infecções tanto das vias aéreas superiores quanto das vias aéreas inferiores, do que os indivíduos não atópicos. Um importante mecanismo de defesa pulmonar é representado pelos macrófagos alveolares tanto na fagocitose de partículas, bactérias e vírus, e como mediadores de processos que envolvem outros tipos de células (Stenson, 1980). No entanto, Fitzpatrick et al. (2008) demonstraram que os macrófagos alveolares de crianças com asma apresentavam fagocitose diminuída frente aos agentes bacterianos. Fato similar foi demonstrado por Alexis et al. (2003) que encontraram um decréscimo da função fagocitária de macrófagos do escarro induzido, monócitos e neutrófilos do sangue periférico frente a inalação de endotoxinas pelos indivíduos com asma. Entretanto, o efeito dos corticosteróides na fagocitose pelos fagócitos ainda está pouco esclarecido na asma. Norris (1977) demonstrou que a terapia com prednisona em dias alternados não afetou a capacidade quimiotática e de fagocitose dos monócitos circulantes, embora tenha ocorrido uma diminuição

do número destas células no sangue periférico. Resultado similar foi encontrado por Zetterlund et al. (1998) que demonstraram que a budesonida aumentou a fagocitose dos macrófagos do lavado brônquico em nove indivíduos voluntários saudáveis (Zetterlund et al.,1998).

Nosso trabalho demonstrou pela primeira vez a influência do tratamento com corticosteróides inalados por 3 e 6 meses na função fagocitária dos neutrófilos e monócitos de crianças asmáticas. Nossos achados demonstraram que mesmo após 6 meses de tratamento com o CI as funções fagocitárias das crianças asmáticas eram menores que as das crianças controle normais. No entanto, o tratamento por 6 meses promoveu alguma melhora nos parâmetros clínicos, como um aumento no pico de fluxo expiratório, e um aumento significativo no percentual de crianças com asma persistente leve e moderada mostrando ACT > 25 e ACT = 20-24 (tabela 2), apesar de não se observar recuperação da função dos fagócitos. A capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos em crianças com asma persistente leve, moderada e grave, avaliada em nosso estudo, foi menor do que nas crianças saudáveis. A diminuição da fagocitose por monócitos e neutrófilos (Alexis et al., 2003; Lavinskiene et al., 2012) e de macrófagos alveolares (Fitzpatrick et al., 2008; Godard et al.,1982) têm sido demonstrada em indivíduos asmáticos.

A severidade da asma, em nosso estudo, não influenciou a imunodeficiência dos fagócitos, uma vez que os índices fagocitários dos neutrófilos e monócitos de crianças com asma persistente leve, moderada ou grave estavam reduzidos, sem diferença entre os grupos. Nossos dados diferem dos de Fitzpatrick et al (2008) que observaram maiores deficiências em pacientes com asma grave, e Lay et al.

(2008) que demonstrou aumento da fagocitose por macrófagos do escarro de pacientes com asma. Nossos dados estão de acordo com os dados de Alexis et al. (2001) que demonstraram menor função fagocitária dos macrófagos bronquiais obtidos de escarro induzido de 20 indivíduos com asma leve e 20 indivíduos controles. E de Godar et al. (1981) que demonstrou que a viabilidade e a atividade funcional dos macrófagos alveolares em pacientes asmáticos estava diminuída e guardava uma relação com a eosinofilia do sangue periférico. Vale ressaltar que as diferenças observadas entre os nossos achados e o de outros autores que também avaliaram a fagocitose na asma podem ser devidas a vários fatores, como a faixa etária estudada, o tipo de célula avaliada, a gravidade da asma, a apresentação clínica da doença, a fonte de obtenção do material para exame (escarro induzido, sangue periférico, lavado brônquico, etc.), além de diferenças genéticas entre os indivíduos (Fitzpatrick et al., 2008; Alexis et al., 2003; Lavinskiene et al., 2012; Alexis et al., 2001; Lay et al., 2008; Godard et al., 1981).

Nossos achados demonstraram uma deficiência na fagocitose avaliada tanto por meio de receptores de padrões moleculares associados a patógenos (não sensibilizados) quanto por meio de receptores para o complemento e/ou receptores para a porção Fc dos anticorpos (sensibilizados).

Para que ocorra a fagocitose, os fagócitos têm que se movimentar ao encontro da *S. cerevisiae* e ingeri-la. Considerando que a redução na fagocitose deveu-se ao menor envolvimento quantitativo dos fagócitos na fagocitose, podemos supor que os fagócitos em crianças com asma tenham a capacidade diminuída de se mover em direção à levedura. De fato, foi demonstrado anteriormente que β 2-agonistas e glucocorticóides, que são normalmente

utilizados para o tratamento de doenças pulmonares obstrutivas, influenciam a liberação de quimiocinas e a sensibilidade do receptor e, conseqüentemente, a quimiotaxia destas células (Strandberg et al.,2010).

Quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para opsoninas, a deficiência deveu-se tanto ao menor envolvimento dos fagócitos na fagocitose quanto à menor ingestão das leveduras pelos fagócitos. Os mecanismos pelos quais estes fenômenos ocorrem não foram esclarecidos em nosso trabalho. No entanto, uma possível explicação seria uma diminuição na expressão de receptores para o complemento e/ou fração $Fc\gamma$ da IgG nas membranas dos monócitos e neutrófilos de pacientes com asma, desde que Alexis et al. (2003) demonstraram uma relação significativa entre a expressão de CD64 ($Fc\gamma R$) e fagocitose por macrófagos de indivíduos com asma e redução da expressão de CD11b, um componente do receptor de CR3, e fagocitose no escarro e em neutrófilos e monócitos de indivíduos com asma.

Apesar da ocorrência de melhora clínica da asma com o tratamento com corticóide inalatório, uma das possibilidades para explicar por que não houve recuperação da fagocitose após seis meses de tratamento com o corticóide seria o efeito prejudicial do corticóide sobre os fagócitos. Tal fato já foi demonstrado por alguns pesquisadores, de que a fagocitose por monócitos e a produção de citocinas inflamatórias podem ser deprimidas pela ação do corticóide (Donnelly et al.,2012; Barnes, 2006). Por outro lado, os corticóides já demonstraram que podem aumentar a produção de IL-10, que por sua vez, desativaria os monócitos (Barnes, 2006; Barnes, 2011). Assim, a fagocitose no nosso estudo pode não ter retornado ao normal pela ação do corticóide nos fagócitos, ou pelo fato de que a

insuficiente recuperação clínica seria responsável pela manutenção das alterações imunológicas observadas nas funções dos fagócitos.

A produção de ânion superóxido foi avaliada pela porcentagem de redução do corante *nitroblue tetrazolium* pelos fagócitos de crianças com asma ou controle. Observamos uma diminuição significativa apenas nas crianças com asma persistente leve. E a resposta após 6 meses de tratamento com CI diferiu conforme avaliação basal (sem estímulo) ou após estímulo. O CI aumentou a redução percentual do NBT apenas para a avaliação sem estímulo, no entanto, esses valores não excederam aos valores observados em crianças normais. Quando a produção de ânion superóxido foi avaliada após estimulação com *S. cerevisiae* sensibilizadas, observou-se diminuição na produção de ânion superóxido. É possível que a diminuição da fagocitose possa ter desempenhado um papel na diminuição da produção de ânion superóxido por estas células.

Vários processos fisiológicos são desenvolvidos nas células envolvendo vias enzimáticas ou processos químicos que liberam várias espécies de radicais de oxigênio (ROS) quando diante de agentes patogênicos. Por outro lado, níveis altos de ROS podem produzir distúrbios fisiopatológicos danosos ao DNA, lipídios, proteínas e hidratos de carbono, aumentando a resposta inflamatória (Zuo et al., 2013). Além disto, o stress oxidativo pode desencadear a contração do músculo liso, induzir hiper-responsividade das vias aéreas, e aumentar a secreção de muco, e a produção de ROS em excesso pode provocar alterações importantes, levando a um desequilíbrio antioxidante-oxidante que foi mostrado em pacientes com asma e diferem significativamente de acordo a gravidade da doença (Zuo et al., 2013; Ahmad et al.,2012; Celik et al., 2012; Pennings et al.,1999).

Outros trabalhos mostraram que os fagócitos produzem diferentes espécies de radicais de oxigênio dependendo da forma da doença e se em estado de repouso ou estimulados (Vachier et al., 1994). Produção aumentada de ROS tem sido observada na asma (Ahmad et al., 2012; Celik et al., 2012; Vachier et al., 1994). As diferenças entre as nossas observações e outros investigadores que avaliaram ROS na asma são provavelmente o resultado do tipo de ROS avaliado, o tipo de célula e diferenças nas formas clínica e da gravidade da doença.

A influência do tratamento com corticóide sobre a produção de radicais livres tem sido avaliada. Observou-se que a budesonida reduziu o stress oxidativo em cobaias (Long et al., 2008) e o CI foi capaz de influenciar a produção de NADP-oxidase na dependência da dose (Ökrös et al., 2012). Majori et al. (1998) demonstrou em 27 indivíduos adultos com asma controlada ou não controlada, que tanto o uso por curto tempo de corticóide oral, quanto o uso a longo prazo de corticóide inalatório inibiram a liberação de anion superóxido pelos monócitos no sangue periférico. Utilização de glucocorticóides como antioxidantes tem sido sugerida com base nas suas propriedades antioxidantes (Sadowska et al., 2007). Pennings et al. (1999) avaliou 40 crianças com asma leve, tratadas com 250mcg de Beclometasona, duas vezes ao dia, por seis semanas, e observou uma diminuição na produção de ROS. Nós só observamos a influência do CI na asma persistente leve. Uma possível explicação da resposta diferente observada por nós é o tipo de ROS analisado e a célula testada.

O estresse oxidativo leva ao aumento da peroxidação lipídica, o aumento da reatividade e secreções em vias aéreas, a produção de moléculas quimiotáticas e aumento da permeabilidade vascular (Nadeem et al., 2003, Barnes, 1990, Birben et al., 2012, Szeffler et al., 2012) que em conjunto conduzem

ao aumento da inflamação, que é uma característica da asma. Por conseguinte, menor produção de radicais de oxigênio na asma poderia ter diminuir a imunopatogênese da doença. Por outro lado, uma menor produção de superóxido poderia levar a imunodeficiência e dificultar a defesa imunitária contra agentes infecciosos.

Apesar dos corticosteróides inalatórios se constituírem em drogas de primeira escolha no tratamento da asma, o número de crianças que atingiram total controle clínico, avaliado pelo ACT (> 25) por 6 meses, neste estudo, foi pequeno. Uma variabilidade significativa na resposta aos corticosteróides inalados para a asma persistente tem sido mostrada (Szefer et al., 2002), e asma não controlada ocorre em mais de 50% das crianças que recebem tratamento com baixa dose de corticosteróides inalados (Sorkness et al., 2007). É possível que esta pequena resposta clínica tenha sido devida ao grande percentual de asma persistente moderada e grave entre as crianças avaliadas neste estudo. Além disso, apesar da adesão ao tratamento ter sido encorajada em cada avaliação clínica, não há nenhuma garantia sobre o uso regular do CI durante o período de follow-up, uma vez que as crianças foram tratadas em suas respectivas residências. Esta incerteza é uma limitação do nosso estudo. A idade menor das crianças asmáticas do que as crianças controle normais também foi uma limitação, no entanto, já havíamos mostrado que não há diferenças na fagocitose entre crianças maiores de 2 anos (Muniz-Junqueira et al., 2003). Neste estudo as crianças foram tratadas com diferentes CI (beclometasona, budesonida ou fluticasona), que é outra limitação do estudo. Outra possível limitação do nosso estudo é o fato de que a fagocitose foi avaliada em fagócitos obtidas do sangue periférico e não de expectoração induzida ou lavagem broncoalveolar, a fim de

avaliar diretamente os efeitos da doença e do tratamento sobre a função fagocítica, a nível local. No entanto, a asma é uma doença sistêmica com diversas citocinas e outras moléculas aumentadas no sangue periférico que podem influenciar as funções de células do sistema imunológico e a fagocitose e podem ser influenciados pelo tratamento com corticóide, como se verificou neste estudo. Em apoio a esta consideração, as alterações morfológicas nos eosinófilos obtidos do sangue periférico marcadamente se correlacionam com a gravidade da doença e pode indicar a gravidade da exacerbação clínica aguda da asma (Muniz-Junqueira et al., 2013), confirmando que as células de sangue podem também ser influenciadas pela resposta imune que ocorre em indivíduos asmáticos. Além disso, a indução de expectoração pode ser um desafio para as crianças (Gogate et al., 2008), e a influência sobre a fagocitose de muco (Voynow et al., 2009), de enzimas (Maneechotesuwan et al., 2008) e microorganismos (Marri et al., 2013) presentes na expectoração não podem ser excluídos, além da limitação ética de avaliar a fagocitose em fagócitos de lavado bronco-alveolar.

Em conclusão, nossas observações podem ampliar a compreensão acerca da influência de corticóides inalatórios nas funções fagocíticas dos neutrófilos e monócitos de crianças com asma. Nossos dados mostraram que não houve normalização da fagocitose nas crianças asmáticas acompanhados por 6 meses em tratamento com o CI. No entanto, a produção basal de ânion superóxido pelos fagócitos voltou aos valores normais nas crianças com asma persistente leve. Pelo fato dos fagócitos poderem participar ativamente tanto na lesão quanto na defesa do pulmão na asma, é possível que o resultado destes efeitos opostos tenham sido benéficos para as crianças tratadas, uma vez que houve alguma

melhoria clínica. Além disso, a redução nas lesões provocadas por radicais de oxigênio pode também ter gerado algum benefício para as crianças tratadas.

Outro aspecto relevante de nossos dados foi a demonstração de que as alterações morfológicas nos eosinófilos em crianças e adolescentes com asma podem servir como um parâmetro objetivo para acompanhar o tratamento com o corticóide inalatório. O espriamento, a emissão de grânulos em pequena e moderada quantidade, a emissão de pseudópodes localizados e eosinófilos com contato entre células foram mais frequentemente observados nas crianças com asma persistente leve ou moderada antes do tratamento e voltaram para níveis comparáveis aos das crianças saudáveis após seis meses de tratamento com CI. Enquanto as crianças com asma persistente grave apresentaram a emissão de grânulos em pequena quantidade mais frequentemente do que as crianças saudáveis, mas estas alterações não diminuíram mesmo após seis meses de tratamento. Sugerindo que as crianças com a forma grave da asma persistente necessitará mais tempo de tratamento para obter o controle clínico e demonstrando um comportamento diferente neste grupo de maior gravidade da asma.

Considerando a importância de se conhecer o padrão inflamatório do paciente com asma, bem como a resposta ao tratamento habitual com corticóide inalatório, a análise morfológica dos eosinófilos, em indivíduos com asma, poderia se constituir em uma prática laboratorial de rotina para fornecer dados de acompanhamento mais objetivos do estado de controle da asma.

8. CONCLUSÕES

Em relação à ativação de eosinófilos:

1. Observamos menor porcentagem de eosinófilos normais não ativados antes do tratamento nas crianças com asma independentemente da gravidade da doença, comparada as crianças controle normais; O tratamento com corticóide inalatório por seis meses aumentou significativamente a porcentagem de eosinófilos normais não ativados nas crianças com asma persistente leve e persistente moderada;
2. Houve maior porcentagem de eosinófilos com espraiamento antes do tratamento para as crianças com asma leve e moderada comparadas as crianças controle normais. O tratamento com corticóide inalatório por seis meses diminuiu significativamente a porcentagem de eosinófilos com espraiamento nas crianças com asma persistente leve;
3. Ocorreu maior porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em pequena quantidade, antes do tratamento, nas crianças com asma sem distinção com a gravidade da asma, comparadas as crianças controle normais; O tratamento com corticóide inalatório por seis meses diminuiu significativamente a porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em pequena quantidade apenas nas crianças com asma persistente leve e moderada.
4. Houve maior porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em moderada quantidade, antes do tratamento, nas crianças com asma persistente leve e persistente moderada, em comparação com as crianças controle normais; O tratamento com corticóide inalatório por seis meses diminuiu significativamente a porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em

moderada quantidade, nas crianças com asma persistente leve e persistente moderada e grave.

5. Observamos maior porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em grande quantidade, aos 3 meses de tratamento, nas crianças com asma persistente grave; Maior porcentagem de eosinófilos emitindo pseudópodes localizados, antes do tratamento, nas crianças com asma persistente leve e moderada; O tratamento com corticóide inalatório por seis meses diminuiu significativamente a porcentagem de eosinófilos emitindo pseudópodes apenas nas crianças com asma persistente leve e persistente moderada.
6. Houve maior porcentagem de eosinófilos com contato entre células, antes do tratamento, nas crianças com asma persistente leve comparada as crianças controle normais. O tratamento com corticóide inalatório por seis meses diminuiu significativamente a porcentagem de eosinófilos com contato entre células nas crianças com asma sem distinção de gravidade da doença;
7. Houve maior porcentagem de eosinófilos em degeneração celular, antes do tratamento, nas crianças com asma persistente leve e moderada comparadas as crianças controle normais. O tratamento com corticóide inalatório por seis meses diminuiu significativamente a porcentagem de eosinófilos em degeneração celular apenas para as crianças com asma persistente moderada.

Em relação à função fagocitária:

8. Menor função fagocitária dos neutrófilos antes do tratamento nas crianças com asma sem distinção da gravidade da doença, comparadas as crianças controle normais, em todos os parâmetros avaliados, com menor ou maior proporção de leveduras por fagócito e quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para padrões moleculares ou por meio de opsoninas.
9. O tratamento com corticóide inalatório por seis meses modificou significativamente a função fagocitária dos monócitos (não sensibilizados - 20/1) nas crianças com asma persistente moderada, porém não foi suficiente para atingir a normalidade;

Em relação ao NBT

10. Menor porcentagem de redução de NBT basal nas crianças com asma persistente leve antes do tratamento;
11. O tratamento demonstrou dois efeitos diferentes, um foi o aumento significativo da porcentagem de redução para o NBT basal, e o outro foi a diminuição da porcentagem de redução quando utilizado o NBT estimulado, ambos, nas crianças com asma persistente leve.

9. REFERÊNCIAS

1. Ahmad A, Shameem M, Husain G: Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. *Ann Thoracic Med* 2012; **7**: 226-232.
2. Alexis NE, Eldrige MW, Peden DB. Effect of inhaled endotoxin on airway and circulation inflammatory cell phagocytosis and CD11b in atopic asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;**112** (2):353-361.
3. Alexis NE, Soukup J, Nierkens S, Becker S. Association between airway hyperreactivity and bronchial macrophage dysfunction in individuals with mild asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;**280**(2):L369-L375.
4. Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med*. 2003. **35**:213-225.
5. Bakakos P, Schleich F, Alchanatis M & Louis R. Induced Sputum in Asthma: From Bench to Bedside. *Current Medicinal Chemistry*. 2011;**18**:1415-1422.
6. Barnes PJ: Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 1990, **9**: 235-243.
7. Barnes PJ: How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 2006, **148**: 245–254.
8. Barnes PJ. Severe asthma: Advances in current management and future therapy. *JACI* 2011;**129**(1):48-59.
9. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O: Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO J* 2012, **5**: 9-19.

10. Black PN, Scicchitano R, Jenkins CR, Blasi F, Allegra L, Wlodarczyk J, Cooper BC: Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. *Eur Respir J*. 2000; **15**: 254–259.
11. Borrish L & Cup JA. Asthma: a syndrome composed of heterogeneous diseases. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2008; **101**:1-9.
12. Bousquet J, Chanez, P, Lacoste JY, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. 1980; **122**: 709–719.
13. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M & Vignola AM. Asthma from bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. *Amer J Respir and Crit Car Med*. 2000; **161** : 1720-1745.
14. Bousquet, J; Chanez, P; Lacoste, JY. Eosinophilic inflammation in asthma. *New England Journal of Medicine*. 1990. **323**:1033-1039.
15. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, Tsartsali L, Lloyd CM, Bush A & Saglani S. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T_H2 cytokines. *American Journal of Allergy*, 2012; **129**(4).
16. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E: Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002; **347**: 869–877.
17. Busse et al, 2007. Expert Panel Report (EPR): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report. *JACI*, **120**(5):S94-S138.
18. Calhoun WJ, Reed HE, Moest DR, Stevens CA. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental

- antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:317-25.
19. Carmichael J, Paterson IC, Diaz P, Crompton GK, Kay AB & Grant IWB. Corticosteroids resistance in chronic asthma. *Br. Med J.*, 1981; **282**:1419-1422.
20. Celik M, Tuncer A, Soyer OU, Sac, kesen C, Tanju Besler H, Kalayci O: Oxidative stress in the airways of children with asthma and allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2012, **23**: 556-561.
21. Chan M, Sitaraman S & Dosanjh A. Asthma Control Test and peak Expiratory Flow Rate: Independent pediatric Asthma Management Tools. *J Asthma* 2009; **46**:1042-1044.
22. Chanez P, Dent G, Yukawa T, Barnes PJ, Chung KF. Generation of oxygen free radicals from blood eosinophils from asthma patients after stimulation with PAF or Phorbol ester. *Eur Respir J.* 1990; **3**:1002-1007.
23. Choi Jae-Sung, Jang S, Park JS, Park SW, Paik SH, park JS, Uh Soo-Taek, Kim yong-Hoon & Park CS. Role of neutrophils in persistente airway obstruction due to refractory asthma. *Respirol.* 2012; **17**:322-329.
24. Clutter-Buck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* 1989; **73**: 1504 –1512.
25. Cluzel M, Damon M, Chanez P, Bousquet J, Crastes De Paulet A, Michel FB, Godart P. Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1987. **80**:195-201.

- 26.IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol.* 2006;32 (Supl 7): S 447-S 474.
- 27.Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma-2012.*J Bras Pneumol.*V38, Suplemento 1, pS1-S46.Abril 2012.
- 28.Donnely, L E; Barnes, P J. Defective Phagocytosis in Airways Disease.*Chest* ,2012;**141**:1055-1062.
- 29.Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, chronic bronchitis and in emphysema. *Thorax.* 1969; **24**:176-179.
- 30.Dvorak AM, Ackerman SJ, Weller PF. Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils. *Blood Cell Biochem.* 1991; **2**:237–344.
- 31.Dvorak AM, Ishika T. Human eosinophils *in vitro*. An ultrastructural morphology primer. 1994. *Histology and histopathology.* **9**: 339-374
- 32.Erjefalt JS, Andersson M, Greiff L, Korsgren M, Gizycki M, Jeffery PK & Persson CGA. Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. *JACI* 1998;**102(2)**:286-294.
- 33.Erjefalt JS, Persson CGA. New aspects of degranulation and fates of airway mucosal eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**:2074–2085.
- 34.Fahy JV.Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma. Insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc* 2009; **6**:256-259.
- 35.Fireman P .Understanding asthma pathophysiology. *Allergy. Asthma Proc* 2003; **24**:79-83.

36. Fitzpatrick, A M; Holguin, F; Teague, W G; Brown, L A S. 2008. Alveolar macrophage phagocytosis is impaired in children with poorly controlled asthma. *JACI*,2008. **121**: 1372-1378.
37. Fleming L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Use of sputum eosinophil counts to guide management in children with severe asthma. *Thorax* 2012;**67**:193-198.
38. Fleming L, Wilson n & Bush A. Difficult to control asthma in children. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*,2007;**7**:190-195.
39. Fukuda T, Dunnette SL, Reed CE, Ackerman SJ, Peters MS, Gleich GJ. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; **132**: 981–985.
40. Gern JE. Viral respiratory infection and the link to asthma. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; **27**:S97.
41. Gibeon D, Chung KF. The investigation of severe asthma to define phenotypes. *Clinical & Experimental Allergy* 2012; **42**(5):678–692.
42. Gibson PG, Saltos N, Borgas T. Airway mast cells and eosinophils correlate with clinical severity and airway hyperresponsiveness in corticosteroid-treated asthma. *J Allergy and Clin immunol* 2000, **105**:752-759.
43. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. Eosinophils. *New York: Raven Press Ltd.*, 1992:663–99.
44. Global Initiative for Asthma – GINA [homepage on the Internet]. Bethesda: Global Initiative for Asthma. [cited 2011 Apr 1] Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2010. [Adobe Acrobat document, 119p.] Available from: http://www.ginasthma.org/pdf/GINA_Report_2010.pdf.

45. GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION
UP DATED 2012 © 2012. Global Initiative for Asthma.
46. Godart P, Chaintreuil J, Damon M, Coupe M, Flandre O, de Paulet AC & Michel FB. Functional assessment of alveolar macrophages: comparison of cells from asthmatics and normal subjects. *JACI* 1982;70(2):88-93.
47. Guilbert TW, Singh AM, Danov Z, Evans MD, Jackson DJ, Burton R, et al. Decreased lung function after preschool wheezing rhinovirus illnesses in children at risk to develop asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011. **128**: 532-538.
48. Gogate S, Katial R: Pediatric biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide, sputum eosinophils and leukotriene E4. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; **8**:154–157.
49. Gundel RH, Letts LG, Gleich GJ. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. / *Clin Invest* 1991; **87**: 1470—3.
50. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Monteiro W, Sousa A, Marshal RP, Bradding P, Green R, Wardlaw AJ & Pavord ID. Mepolizumab an Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *N Engl Med*, 2010; 360;10.
51. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Goudart P, Holgate S, Polak JM (1993) Induction of NOS in asthma. *Lancet* **342**:1510-1513.
52. Heidenreich, S; Kubis, T; Schmidt, M; Fegeler, W. 1994. Glucocorticoid-Induced Alterations of Monocyte Defense Mechanisms against *Candida albicans*. *Cellular Immunology*. **157**:320-327.

53. Henrickis PAJ & Nijkamp FP. Reactive Oxygen Species as Mediators in Asthma. *Pulmonary & Therapeutics*, 2001;14:409-421.
54. Hogan SP. Recent advances in eosinophil biology. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; **143**:S3-S14.
55. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; Jun; **38**(6):872-97.
56. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* 2006; **32** Suppl 7, S447-74.
57. Jarjour MN & Calhoun WJ (1994) Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J Lab Clin Med* **123**:131-136.
58. Jartti, T & Korppi M. Rhinovirus-induced bronchiolitis and asthma development. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; **22**:350-355.
59. Jartti, T, Lehtinen, P, Vuorinen T, Österback R, van den Hoogen B, Osterhaus ADME & Ruuskanen O. Respiratory Picornaviruses and Respiratory Syncytial Virus as Causative Agents of Acute Expiratory Wheezing in Children. *Emerg Infect Dis*. 2004 June; **10**(6): 1095–1101
60. Jatakanon A, Lim S & Barnes PJ. Changes in Sputum Eosinophils Predict Loss of Asthma Control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**:64-72.
61. Johnston SL, Martin RJ: Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae: a role in asthma pathogenesis? *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **172**: 1078–1089.
62. Khanduja, K L; Kaushik, G; Khanduja S; Pathak, C M; Laldinpui J; Behera, D. 2011. Corticosteroids affect nitric oxide generation, total free radicals production, and nitric oxide synthase activity in monocytes of asthmatic patients. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **346**:31-37

63. Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev* 2011;**242**:161–177.
64. Kumar RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvement in therapy. *Pharmacol Ther.* 2001;**91**(2): 93-104.
65. Kuo HP, Yu TR & Yu CT. Hypodense eosinophil number relates to clinical severity airway hyperresponsiveness and to response to inhaled corticosteroids in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1994; **7**:1452–1459
66. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *The Am Review of Respir Dis* 1985, **131**(4):599-606.
67. Lay JC, Alexis NE, Zeman KL, Peden DB, Bennett WD: In vivo uptake of inhaled particles by airway phagocytes is enhanced in patients with mild asthma compared with normal volunteers. *Thorax* 2009, **64**:313-320.
68. Lavinskiene S, Jeroch J, Malakaskas K, Bajoriuniene L, Jackute J, Sakalauskas R: Peripheral blood neutrophil activity during *Dermatophagoides pteronyssinus*-induced late-phase airway inflammation in patients with allergic rhinitis and asthma. *Inflammation* 2012, **35**:1600-1609.
69. Leckie M, Bryan SA, Khan J, Dewar A, Aikman SL, McGrath J, Okrongly DA, Burman J, Barnes PJ, Hansel TT. Automated quantitation of circulating neutrophil and eosinophil in asthmatic patients. *Thorax* 2000;**55**:471-477.
70. Leung DYM, Martin RJ, Szefer SJ, Sher ER, Ying S, Kay AB & Hamid Q. Dysregulation of Interleukin 4, Interleukin 5, and Interferon γ Gene Expression in Steroid-resistant Asthma. *J Exp Med*, 1995; **181**:33-34.

71. Long F, Yan Wang Y, Qi H-H, Xin Zhou X, Xian-Qiao Jin X-Q: Rapid non-genomic effects of glucocorticoids on oxidative stress in a guinea pig model of asthma. *Respirology* 2008, **13**: 227-232.
72. Lopez AF, Williamson DJ, Gamble JR, *et al*. Recombinant human granulocyte - macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest* 1986; **78**: 1220 –1228.
73. Majori M, Vachier I, Godard P, Farce M, Bousquet, Chanez P. Superoxide anion production by monocytes of corticosteroid-treated asthmatic patients. *Eur Respir J* 1998; **11**: 133-138.
74. Malerba M, Ragnoli B, Radaeli A & Tantucci C. Usefulness of Exhaled Nitric Oxide and Sputum Eosinophils in the Long-term Control of Eosinophilic Asthma. *CHEST*, 2008, **134**: 732-739. Rehder J, Newburger PE & Condino-Neto A. Superoxide release and cellular glutathione peroxidase activity in leukocytes from children with persistent asthma.
75. Maneechotesuwan K, Supawita S, Kasetinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes PJ: Sputum indoleamine-2, 3-dioxygenase activity is increased in asthmatic airways by using inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **121**: 43-50.
76. Marçal LE, Rehder J, Newburger PE & Condino-Neto. Superóxide release and cellular glutathione peroxidase activity in leukocytes from children with persistent asthma. *Braz J Med Biol Res*, 2004; **37**(11). 1607-1613.

77. Marri PR, Stern DA, Wright AL, Dean Billheimer D, Martinez FD: Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**:346-52.
78. Martinez, 2003. Respiratory syncytial virus broncholitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J*; **22**: S76-82.
79. Martinez, FD, Wright AL, Taussing LM, Holberg CJ, M, Morgan WJ & Group Health Medical Associates. Asthma and Wheezing in the First Six Years of Life. *N Engl J Med* 1995; **332**:133-138.
80. Meerschaert J, Busse WW, Bertics PJ, Mosher DF: CD14(+) cells are necessary for increased survival of eosinophils in response to lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; **23**: 780–787.
81. Michel O, Dentener M, Corazza F, Buurman W, Rylander R: Healthy subjects express differences in clinical responses to inhaled lipopolysaccharide that are related with inflammation and with atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **107**: 797–804.
82. Ministério da Saúde do Brasil. Departamento de Informática do SUS [homepage on the Internet]. Brasília: DATASUS [cited 2012 Jan 25] . Morbidade hospitalar do SUS – por local de internação – Brasil. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>
83. Muniz-Junqueira MI, Barbosa-Marques SM, Junqueira Jr LF. Morphological changes in eosinophils are reliable markers of the severity of an acute asthma exacerbation in children. *Allergy* 2013; **68**:911-920.
84. Muniz-Junqueira MI, Peçanha LMF, Silva-Filho VL, Cardoso MCA, Tosta CE. Novel Microtechnique for Assessment of Postnatal Maturation of the

Phagocytic Function of Neutrophils and Monocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003; **10**:1096-1102.

85. Nair P, Pizzichini MMM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimias A, Pizzichini E, Hargreave FE & O'Byrne PM. Mepolizumab for Prednisone-Dependent Asthma with Sputum Eosinophilia. *N Engl J Med* 2009; **360**:985-93.
86. Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, Raj HG: Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003, **111**: 72.
87. Nakamura Y, Azuma M, Okano Y, et al. Upregulatory effects of interleukin-4 and interleukin-13 but not interleukin-10 on granulocyte/macrophage colony-stimulating factor production by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; **15**: 680–687.
88. Nightingale JA, Rogers DF, Hart LA, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ: Effect of inhaled endotoxin on induced sputum in normal, atopic, and atopic asthmatic subjects. *Thorax* 1998; **53**: 563–571.
89. Norzila MZ, Fkes K, Henry RL, Simpson J & Gibson PG. Interleukin-8 Secretion and Neutrophil Recruitment Accompanies Induced Sputum Eosinophil Activation in Children with Acute Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**:769-774.
90. Norris DA, Fine R, William L & Spector S. Monocyte cellular function in asthmatic patients on alternative-day steroid therapy. *JACI* 1977; **61**(4):255-260.
91. Ökrös Z, Endreffy E, Novak Z, Maroti Z, Monostori P, Varga IS, Király A, Turi S: Changes in NADPH oxidase mRNA level can be detected in blood

- at inhaled corticosteroid treated asthmatic children. *Life Sci* 2012, **91**:907-911.
92. Owen WF, Rothenberg ME, Petersen J, *et al*. Interleukin 5 and phenotypically altered eosinophils in the blood of patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J Exp Med* 1989; **170**:343–348.
93. Palmer RMJ, Ferridge AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987; **327**:524-526.
94. Pavord ID, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997; **52**:498-501.
95. Pennings HJ, Borm PJA, Evelo CTA & Wouters EFM. Changes in levels of catalase and glutathione in erythrocytes of patients with stable asthma, treated with beclomethasone dipropionate. *EUR Respir J* 1990; **13**:1260-1266.
96. Peroni DG, Piacentini GL, Bodini A, Boner AL. Childhood asthma control test in asthmatic children with dysfunctional breathing. *JACI* 2008; **121** :266-267.
97. Peters MS, Gleich GJ, Dunnette SL, Fukuda T. Ultrastructural study of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome: a morphological basis of hypodense eosinophils. *Blood* 1988; **71**:780–5.
98. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Ann Efthimiadis MLT, Dolovich J & Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: Eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *JACI* 1996; **99**(4)539-544.

99. Portelli M & Sauers I. Genetic basis for personalized medicine in asthma. *Expert Rev. Respir. Med.* 2012, **6**(2):223-236.
100. Pronk-Admiraal CJ, van Haaster FE & Bartels PCM. Clinical Evaluation of Changes in the Morphology of Eosinophils 2002; *Clin Chem Lab Med* 2002; **40**(1):27–31.
101. Rantala A, Jaakkola JJK & Jaakkola MS. Respiratory Infections in Adults with Atopic Disease and IgE Antibodies to Common Aeroallergens. *PLoS One.* 2013 ; 8 (7):e68582.
102. Rawlinson WD, Waluizzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM & Morton JR. Asthma Exacerbations in Children associated with Rhinovirus but not Human Metapneumovirus Infection. *The Journal of Infections Diseases* 2003;**187**:1314-8.
103. Robinson DQ, Ying HS, Bentley A, Assoufi B, Durham S & Kay AB. Prednisone treatment in asthma is associated with modulation of bronchoalveolar lavage cell interleukin-4, interleukin-5, and interferon- γ cytokine gene expression. *Am Rev Respir Dis*, 1993;**148**:401-406.
104. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant T_{he}-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 1992;**326**:298-304.
105. Rothenberg ME, Owen WF Jr, Silberstein DS, et al. Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* 1988;**81**: 1986–1992.

106. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, HorsburghMJ, Foster SJ, Vogel SN , Dower SK, WhyteMK: Selective roles for Toll-like receptor(TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophilactivation and life span. *J Immunol* 2003; **170**: 5268–5275.
107. Sadowskaa AM, Klebeb B, Germonpré P, De Backer WA: Glucocorticosteroids as antioxidants in treatment of asthma and COPD. New application for an old medication? *Steroids* 2007, **72**: 1-6.
108. Sawicki, G and Haver, K. Chronic asthma in children younger than 12 years: Definition, epidemiology, and pathophysiology. UpToDate, 2013.
109. Schliemer RP.Effects of glucocorticoids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma.*Am Rev. Respir. Dis* 1990;**141**:S59-S69.
110. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosiniphils in innate immunity an evolving story.*Cell Tissue Res* 2011;343;57-83.
111. Sher ER, Leung DYM, Surs W, Kam JC, Zieg G, Kamada AK & Szeffler SJ. Steroid-resistant Asthma. *J.Clin. Invest*,1994;**93**:33-39.
112. Singh, S R; Hullet, K; Pillar, S R; Dennis, V A; Oh, M, Scissim-Gunn. Mucosal immunization with recombinant MOMP genetically linked with modified cholera toxin confers protection against Chlamydia trachomatis infection.*Vaccine* 2006; **24**:1213-1224.
113. Snijders D, Agostini S, Bertuola F, Panizzolo C, Baraldo S, Turato G, Faggian D, Plebani M, Saetta M & Barbato A.Markers of eosinophilic and neutrophilic inflammation in bronchoalveolar lavage of asthmatic and atopic children. *Allergy* 2010;**65**:978-985.

114. Solé D, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, Pastorino AC, Jacob CM, Gonzalez C, et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema in Brazilian adolescents related to exposure to gaseous air pollutants and socioeconomic status. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;**17**(1):6-13.
115. Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK; ISAAC - Brazilian Group. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. *J Pediatr* 2006 ;**82**(5):341-6.
116. Sorkness CA, Lemanske RF Jr, Mauger DT, Boehmer SJ, Chinchilli VM, Martinez FD, Strunk RC, Szeffler SJ, Zeiger RS, Bacharier LB, Bloomberg GR, Covar RA, Guilbert TW, Heldt G, Larsen G, Mellon MH, Morgan WJ, Moss MH, Spahn JD, Taussig LM. Long-term comparison of 3 controller regimens for mild-moderate persistent childhood asthma: the Pediatric Asthma Controller Trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007,**119**: 64-72.
117. Stenson WF & Parker CW. Prostaglandins, macrophages and immunity. *J Immunol* 1980;**125** (1):88-93.
118. Stevenson EC, Turner G, Hearey LG. Bronchoalveolar lavage findings suggest two diferente forms of childhood asthma.*Clin Expert Allergy* 1997;**9**:1-27-1035.
119. Strandberg K, Blidberg K, Sahlander K, Palmberg L, Larsson K: Effect of formoterol and budesonide on chemokine release, chemokine

- receptor expression and chemotaxis in human neutrophils. *Pulm Pharmacol Ther* 2010, **23**: 316-323.
120. Szeffler SJ. Advances in pediatric asthma in 2011: Moving forward. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**(1):60-68.
121. Vachier I, Damon H, Le-Doucon C, De pauletChanez P, Michel FB, Godart P. Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis*.1992. **146**:1161-1166.
122. Van der Goes A, HK, Van der Berg TK, Dijkstra C. Dexamethasone promotes phagocytosis and bacterial killing by human monocytes/macrophages in vitro. *J of Leuk Biol* 2000; **67**:801-807.
123. Venge P, Hakansson L, Peterson CGB. Eosinophil Activation in Allergic Disease. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1987. **82**: 333-337.
124. Voynow J, Rubin BK: Mucins, Mucus, and Sputum. *Chest* 2009; **135**:505–512.
125. Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1988. **137**: 62-69.
126. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **160**:1001.
127. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *The Lancet*, 2006; **368** (V) Issue p 537.p705.

128. Werb Z, Foley e & Munck A. Interaction of glucocorticoids with macrophages. Identification of glicocorticoids receptors in monocytes and macrophages. *J Exp Med* 1978;**147**,1684.
129. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergy in Chidhood (ISAAC). *EurRespir J*. 1998;**12** (2).
130. Zetterlund A, Larsson PH, Muller-Suur S, Palmberg L 7 larsson K. Budesonide but not terbutaline decreases phagocytosis in alveolar macrophages. *Respir Med* 1998;**92**:162-166.
131. Zimmerman B, Lanner A, Enander I, Zimmerman RS, Peterson CGB & Ahlstedt S. Total blood eosinophils, serum eosinophil cationic protein and eosinophil protein X in childhood asthma: relation to disease status and therapy. *Clinical & Experimental Allergy* 2006; **23** (7):564-570.
132. Zuo L, Otenbaker NP, Rose BA, Katherine S. Salisbury KS: Molecular mechanisms of reactive oxygen species-related pulmonary inflammation and asthma. *Mol Immunol*, 2013: **56**: 57- 63.

10.ANEXOS

Anexo 1 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 002/2007

Título: Influência do tratamento de manutenção com corticóide inalatório no estado de ativação dos eosinófilos e função dos fagócitos em crianças e adolescentes portadores de asma persistente correlacionando com a evolução clínica e o controle da doença

Pesquisador responsável: Maria Imaculada M. B. Junqueira

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 11/01/2007

Proposição do(a) relator(a)

() Aprovação

() Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 24/01/2007

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 31/01/2007

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 31/01/2007, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 01 de fevereiro de 2007.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Santos
Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina - UnB

Anexo 2- TCLE



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-FACULDADE DE MEDICINA
ÁREA DE PATOLOGIA, LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA.

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DE MANUTENÇÃO COM CORTICÓIDE INALATÓRIO NO ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS E FUNÇÃO DOS FAGÓCITOS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES PORTADORAS DE ASMA PERSISTENTE.

RESPONSÁVEIS: **Orientadora: Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira e Doutoranda Dra. Carmen Livia Faria da Silva Martins**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Indivíduo portador de asma persistente/ou indivíduo controle normal/menor de idade, com cópia para os pais ou responsáveis).

Eu,.....,.....anos de idade, abaixo assinado, pai ou mãe ou responsável pelo(a) menor.....,anos de idade, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte, para indivíduos controles normais(1) ou indivíduos com asma(2):

1. Estou participando de minha livre vontade, de uma pesquisa que usa células do sangue do meu filho, para comparar com pacientes com pacientes asmáticos, uma vez que não tenho a doença, sendo feita uma única coleta de sangue.
2. Estou participando de minha livre vontade, de uma pesquisa que usa células do sangue do meu filho para estudar sobre como funcionam com o tratamento que estou recebendo.
3. Serão realizadas três coletas: no início do tratamento, aos três meses e aos seis meses;
4. Concordo que seja retirado de 1 a 10 ml de sangue de uma veia do braço dele (a) utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.
5. Posteriormente se eu desejar poderei ser informado (a) sobre o resultado do exame que será feito no sangue do meu filho (a);
6. Fui esclarecido (a) que o nome dele (a) não será divulgado.
7. Fui esclarecido (a) que se eu não quiser autorizar a participação do meu filho (a) neste projeto, ele (a) continuará o seu tratamento neste Serviço sem prejuízo à sua assistência à saúde.
8. Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com: Dra. Carmen Livia Faria da Silva Martins pelo celular: 99821162/32749200.

Responsável: _____

Testemunha: _____

Pesquisador: _____

Brasília,..... de de20..

Anexo 3

PROTÓCOLO CLÍNICO DE PESQUISA



Carmen Livia Faria da Silva Martins
 ORIENTADORA: Profa. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira
 Laboratório de Imunologia, Área de Patologia.
 Faculdade de Medicina / Universidade de Brasília

1. Identificação: PACIENTE

Registro HUB:	Registro no Ambulatório:	
Data de nascimento: __/__/__	Idade:	Gênero: Fem () Masc ()
Nome:		
Filiação:		
Endereço e telefone:		

2. Critérios de Inclusão:

- Crianças acima de dois anos e adolescentes até 18 anos portadores de asma atendidos no Ambulatório de Asma do Centro de Clínicas Pediátricas do HUB-UnB originados de demanda interna ou externa.
- Concordância dos pais ou responsáveis, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em participar da Pesquisa.

3. Critérios de Exclusão:

Neoplasias; Diabetes; Síndrome de Down ou outras síndromes genéticas; Doenças de depósitos ou Erros inatos do metabolismo; Doenças da Tireóide; Doença Celíaca; Fibrose Cística; Doenças auto-imunes (ARJ, LES, Dermatomiosite, etc.); Doenças de Base: renal, cardíaca, hepática); Outras doenças pulmonares: intersticiais, displasia broncopulmonar; Tuberculose; Aids; Hipo/Agamaglobulinemia; Doença de Crohn; Uso de imunossupressor.

4. Formas Clínicas Associadas

Dermatite atópica: € Sim Não
 Tratamento:

Rinite alérgica: € Sim Não
 Tratamento:

5-Classificação Inicial da Gravidade da Asma (IV Consenso de Manejo da Asma, 2006).

Parâmetros	INTERMITENTE	P.LEVE	P.MODERADA	P.GRAVE
8.1.1.1 Sintomas diurnos	€ Raros	€ Semanais	€ Diários	€ Diários ou contínuos
Despertar noturno	€ Raros	€ Mensais	€ Semanais	€ Quase diários
β2 alívio	€ Raramente	€ Eventual	€ Diária	€ Diária
Limitação atividades	€ Nenhuma	€ Presente nas exacerbações	€ Presente nas exacerbações	€ Contínua
Exacerbações	€ Raras	€ Afeta atividades e Sono	€ Afeta atividades e Sono	€ Frequentes
VEF1 ou PFE	€ ≥80% predito	€ ≥80% predito	€ 60-80%predito	€ ≤60%predito
Variação VEF1 ou PFE	€ < 20%	€ < 20-30%	€ >30%	€ >30%

6. Nível de Controle do paciente com asma (GINA, 2006).

Parâmetros	Controlada	Parcialmente Controlada	Não controlada
Frequência de sintomas diurnos	€ ≤ 2x/ semana	€ > 2x/ semana	3 ou mais características de parcialmente controlada
Limitação para atividades diárias, incluindo exercícios.	€ Ausente	€ Presente	
Sintomas noturnos ou despertar por sintomas de asma	€ Ausentes	€ Presentes	
Uso de medicamento de alívio	€ ≤ 2vezes/ semana	€ > 2x/ semana	
Função pulmonar(PEF ou FEV 1)	€ Normal	€ <80%	
Exacerbações	€ Nenhuma	€ ≥ 1 por ano	

7. ACT=

8. Tempo de coleta

- Grupo I (Estudo Transversal): será realizada uma coleta na consulta de retorno a partir de março de 2008.
- Grupo II (Estudo Longitudinal): Serão realizadas quatro coletas: uma na primeira consulta, quando for feito o diagnóstico clínico de asma e antes de iniciar o uso de corticóide inalatório. Uma aos 3 meses de tratamento. Uma aos 6 meses de tratamento e outra quando o paciente for considerado clinicamente controlado em pelo menos duas consultas consecutivas de retorno (6 meses).
- Nos dois grupos serão colhidos Hemogramas no mesmo momento dos demais testes.

9. Contraindicações gerais para o dia da coleta:

- Processo infeccioso febril agudo; Estar em crise de asma; Uso de Gamaglobulina nos últimos trinta dias.

1ª Coleta: __ / __ / __

IDADE: _____, PESO: _____; P/I: _____, ESTATURA: _____; E/I: _____; IMC= _____; IMC//Sexo

Exames: Hemograma; Aderência de eosinófilos; Fagocitose; NBT; Molécula de superfície; Citocinas. Outros:

Avaliação Clínica: Classificação Inicial da Asma: AI; APL; APM; APG.

Intercorrências: Sim; Não.

Sinais Vitais: FR: _____; FC: _____; SpO²: _____; Peak-flow: _____ %.

ACT:

MEDICAMENTO:

2ª Coleta: __ / __ / __

IDADE: _____, PESO: _____; P/I: _____, ESTATURA: _____; E/I: _____; IMC= _____; IMC//Sexo

Exames: Hemograma; Aderência de eosinófilos; Fagocitose; NBT; Molécula de superfície; Citocinas. Outros:

Avaliação Clínica: Classificação Inicial da Asma: AI; APL; APM; APG.

Intercorrências: Sim; Não.

Sinais Vitais: FR: _____; FC: _____; SpO²: _____; Peak-flow: _____ %.

ACT:

MEDICAMENTO:

3ª Coleta: __ / __ / __

IDADE: _____, PESO: _____; P/I: _____, ESTATURA: _____; E/I: _____; IMC= _____; IMC//Sexo

Exames: Hemograma; Aderência de eosinófilos; Fagocitose; NBT; Molécula de superfície; Citocinas. Outros:

Avaliação Clínica: Classificação Inicial da Asma: AI; APL; APM; APG.

Intercorrências: Sim; Não.

Sinais Vitais: FR: _____; FC: _____; SpO²: _____; Peak-flow: _____ %.

ACT:

MEDICAMENTO:

Anexo 4 - Classificação Inicial da Gravidade da Asma (IV Diretrizes Brasileiras de Manejo da Asma, 2006).

PARÂMETROS	INTERMITENTE	P.LEVE	P.MODERADA	P.GRAVE
Sintomas diurnos	€ Raros	€ Semanais	€ Diários	€ Diários ou contínuos
Despertar noturno	€ Raros	€ Mensais	€ Semanais	€ Quase diários
β2 alívio	€ Raramente	€ Eventual	€ Diária	€ Diária
Limitação atividades	€ Nenhuma	€ Presente nas exacerbações	€ Presente nas exacerbações	€ Contínua
Exacerbações	€ Raras	€ Afeta atividades e Sono	€ Afeta atividades e Sono	€ Frequentes
VEF1 ou PFE	€ ≥80% predito	€ ≥80% predito	€ 60-80% predito	€ ≤60% predito
Variação VEF1 ou PFE	€ < 20%	€ < 20-30%	€ >30%	€ >30%

Anexo 5 - Classificação do Grau de Controle da Asma (Diretrizes Brasileiras para o manejo da Asma, 2012, adaptado da GINA, 2010)

(*correspondência de pontuação X interpretação do ACT).

Parâmetros	Controlada *(ACT ≥ 25 ,No Alvo/Controle Total)	Parcialmente controlada *(ACT=20-24,No alvo/Asma bem controlada)	Não controlada *(ACT < 20, Fora do Alvo/Asma não controlada)
Frequência de sintomas diurnos	€ ≤ 2 x/semana	€ > 2x/semana	3 ou mais características da parcialmente controlada.
Limitação para atividades diárias, incluindo exercícios	€ Ausente	€ Presente	
Sintomas noturnos ou despertar por sintomas de asma	€ Ausentes	€ Presentes	
Uso de medicação de alívio	€ ≤ 2 x/semana	€ > 2 x/ semana	
Função pulmonar (PFE ou VEF 1)	€ Normal	€ < 80%	
Exacerbações	€ Nenhuma	€ ≥ 1 por ano	