FLÁVIA DE AGUIAR FERREIRA

**Perfil celular do lavado broncoalveolar em crianças e
adolescentes com asma de difícil controle**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Dr Joaquim Carlos Rodrigues

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Flávia de Aguiar

Perfil do lavado broncoalveolar em crianças e adolescentes com asma de difícil controle / Flávia de Aguiar Ferreira. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Joaquim Carlos Rodrigues.

Descritores: 1.Aasma/complicações 2.Lavagem broncoalveolar 3.Neutrófilos
4.Testes de função respiratória 5.Criança 6.Eosinófilos

USP/FM/SBD-350/07

Dedicatória

Aos meus pais, Roberto e Mariângela, por todo carinho, amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido Tadeu por todo amor e compreensão. Meu imenso carinho por todos esses anos de caminhada. Meu eterno agradecimento pelo seu constante apoio e paciência.

Aos meus grandes amores Thomas e Pedro.

Agradecimento

Ao Dr Joaquim Carlos Rodrigues, chefe da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mestre e orientador, meu enorme carinho e agradecimento por todos esses anos de ensinamento, incentivo e apoio.

Ao Dr Andrew Bush, professor e chefe da Unidade de Pneumologia do Royal Brompton Hospital pelo auxílio inestimável que possibilitou a realização dessa pesquisa.

Ao Dr Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho, Médico Assistente da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por seu enorme carinho, amizade e incentivo à pesquisa.

Às Médicas Assistentes da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Cleyde Myriam Aversa Nakaie, Joselina Cardieri e Fabíola Villac Adde por todo ensinamento.

À Dra Patrícia Haslam, pela orientação durante a realização dessa pesquisa e pela contribuição na análise estatística.

À Dra Simone Hashimoto, por toda amizade e pela presença em todos os momentos.

À Athya Abdullah, pelo auxílio na parte laboratorial dessa pesquisa.

Ao Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que sempre me acolheu em todos esses anos.

Às crianças e adolescentes do Royal Brompton Hospital, que, gentilmente, permitiram a realização dessa pesquisa, todo o meu carinho.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1. Introdução.....	1
1.1 Asma de Difícil Controle/Resistente ao Tratamento.....	3
1.1.1 Definição	3
1.1.2 Prevalência e Impacto da Asma de Difícil Controle.....	4
1.1.3 Diagnóstico.....	6
1.1.4 Padrões de Asma de Difícil Controle.....	10
1.1.5 Avaliação de Portadores de Asma de Difícil Controle	14
1.1.6 Mecânica Pulmonar e Hiperresponsividade Brônquica	16
1.1.7 Inflamação	17
1.1.8 Remodelamento da Via Aérea	23
1.1.9 Marcadores Inflamatórios	24
2. OBJETIVO	37
3. MÉTODOS.....	39
3.1 População.....	40
3.2 Controles	40
3.3 Critérios de Inclusão	41
3.4 Critérios de Exclusão	41
3.5 Protocolo de Asma de Difícil Controle.....	42
3.6 Broncoscopia	44
3.7 Lavado Broncoalveolar	45
3.8 Coleta de Sangue	47
3.9 Gravidade do Quadro Clínico	47
3.10 Função Pulmonar.....	48
3.11 Análise Estatística	48
3.12 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	48

4. RESULTADOS.....	50
5. DISCUSSÃO	59
5.1 Características da População Estudada	60
5.2 Perfil Inflamatório do Lavado Broncoalveolar.....	61
5.3 Protocolo de Asma de Difícil Controle.....	72
6. CONCLUSÕES.....	75
7. ANEXOS	77
8. REFERÊNCIAS	90
9. APÊNDICES	

Lista de Abreviaturas

ADC	Asma de Difícil Controle
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BB	Biópsia Brônquica
BD	Broncodilatador
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	Corticóide
Cel/ml	Células por Mililitros
CVF	Capacidade Vital Forçada
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECP	Proteína Catiônica Eosinofílica
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
EUA	Estados Unidos da América
GINA	Global Initiative for Asthma
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos
Hab	Habitantes
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HRB	Hiperresponsividade Brônquica
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN-γ	Interferon Gama
IG	Imunoglobulina
IL	Interleucina

ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergy in Childhood</i>
LBA	Lavado Broncoalveolar
LTB4	Leucotrieno
MBP	Proteína Básica Principal
mcg	Microgramas
MEM	Meio Essencial Mínimo
mg	Miligramas
Mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de Mercúrio
MMP	Metaloprotease
NFκB	Fator Nuclear κB
NHLBI	<i>National Heart Lung and Blood Institute</i>
nM	Nanomolar
NS	Não Significativo
ON	Óxido Nítrico
p	Probabilidade
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PaO2	Pressão de Oxigênio no Sangue Arterial
PFE	Pico de Fluxo Expiratório
r	Coeficiente de Correlação
RAST	<i>Radio Allergo Sorbent Test</i>
RB	Remodelamento brônquico
RBH	Hiperresponsividade Brônquica
RC	Receptor do Corticóide

RGE	Refluxo Gastroesofágico
RPM	Rotações por minuto
SaO ₂	Saturação de Oxigênio
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	Célula T Auxiliar
Th1	Célula T Auxiliar do tipo 1
Th2	Célula T Auxiliar do tipo 2
UFC	Unidade Formadora de Colônias
VEF1	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
VRS	Vírus Sincicial Respiratório
%	Percentual

Lista de Figuras

Figura 1 - Mecanismos de resistência ao corticóide	14
Figura 2 - Processo inflamatório na asma (modificado do NHLBI1997).....	18
Figura 3 - Predomínio de macrófagos no lavado broncoalveolar em criança sem patologia pulmonar	19
Figura 4 - Neutrófilos no lavado broncoalveolar.....	21
Figura 5 - Alterações da via aérea em paciente com asma grave	23
Figura 6 - Correlação entre eosinófilos no LBA versus eosinófilos no escarro e eosinófilos no LBA versus óxido nítrico.....	26
Figura 7 - Correlação entre eosinófilos no escarro versus eosinófilos na biópsia brônquica	27
Figura 8 - Correlação entre sintomas e células do LBA	28
Figura 9 - Neutrófilos e Inflamação	29
Figura 10 - Protocolo de asma de difícil controle	44
Figura 11 - Técnica de Coleta e Processamento do LBA	46
Figura 12 - Aumento do percentual de eosinófilos no lavado broncoalveolar de criança portadora de asma de difícil controle	54
Figura 13 - Correlação entre o número de internações nos 12 meses anteriores ao estudo e o percentual de eosinófilos no LBA	56
Figura 14 - Correlação entre a função pulmonar (VEF1 pós broncodilatador) e a idade dos pacientes	57

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Protocolo para avaliação de pacientes	15
Tabela 2 - Celularidade do lavado broncoalveolar em crianças.....	34
Tabela 3 - Características do pacientes.....	51
Tabela 4 - Resultados do lavado broncoalveolar em 24 pacientes com asma de difícil controle tratados com prednisolona comparado aos controles.....	52

Resumo

Ferreira FA. *Perfil do lavado broncoalveolar em crianças e adolescentes com asma de difícil controle* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 99p.

Nós investigamos o perfil inflamatório do lavado broncoalveolar (LBA) em crianças portadoras de asma de difícil controle apesar do tratamento com corticóide oral e sua relação com parâmetros clínicos e funcionais. O LBA foi realizado em 24 crianças com asma de difícil controle (13M/11F; idade média de 13 anos) e 5 controles. Houve aumento do número de neutrófilos em 15 das 24 crianças (60%) portadoras de asma de difícil controle (mediana 15%, 5-43%) e aumento de eosinófilos em 5 pacientes (mediana 9%, 6.5%-18.5%). Observou-se uma correlação entre a necessidade de corticóide oral e o número de internações e o percentual de eosinófilos no LBA. Ocorreu uma tendência de maiores números de neutrófilos no lavado e uma pior função pulmonar. Nós identificamos dois subgrupos de crianças portadoras de asma de difícil controle com características clínicas e funcionais distintas. Pacientes com aumento do percentual de neutrófilos tendem a apresentar uma pior função pulmonar. Um pequeno número de pacientes apresentou um padrão eosinofílico no lavado broncoalveolar com função pulmonar normal, porém sinais de instabilidade clínica.

Summary

Ferreira FA. *Bronchoalveolar lavage cell profile in children and adolescents with severe asthma* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 99p.

Therapy resistant asthma is a major clinical problem in childhood. We investigated the inflammatory cell profile in the airways of children with severe asthma despite systemic steroid treatment and the relationship with clinical and functional severity. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed in 24 children with severe asthma (13M/11F; mean age 12.5 yrs, range 5-14 yrs), and 5 controls. All received prednisolone prior to BAL. Neutrophils were the predominant inflammatory cell type in BAL in 15/24 (60%) children with asthma (median 15%, 5-43%), and only 5 patients had increases in eosinophils (median 9%, 6.5%-18.5%). There was a correlation between higher BAL eosinophils and more admissions. Patients with higher BAL neutrophils showed a trend for lower pre-BAL lung function. We identified subgroups of children with severe asthma presenting different clinical and functional characteristics. Patients with increased percentages in BAL neutrophils showed a trend for lower lung function. A small number of patients presented eosinophilic airway inflammation in BAL with virtually normal lung function but showing signs of clinical instability.

1. INTRODUÇÃO

Asma é uma doença heterogênea caracterizada por diferentes fenótipos, podendo manifestar-se precocemente na infância ou posteriormente na vida adulta. A mais recente definição de asma foi formulada pelo consenso internacional (Global Initiative for Asthma): *“doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células e elementos celulares estão envolvidos. A inflamação crônica causa aumento da hiperresponsividade brônquica levando a episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse principalmente à noite ou ao despertar; usualmente associados com obstrução variável ao fluxo aéreo, parcialmente reversível de forma espontânea ou com tratamento*⁽¹⁾.”

Apesar do progresso significativo no entendimento e tratamento da doença, observou-se um aumento na incidência, prevalência e mortalidade nas últimas quatro décadas, tendo sido reconhecida como a doença respiratória crônica mais comum da infância⁽²⁾. Cerca de 5% das crianças asmáticas apresentam persistência da sintomatologia, não obstante o tratamento adequado da doença. Essas crianças são definidas como portadoras de asma de difícil controle. Apesar da pequena porcentagem em relação ao número total de asmáticos, a sua contribuição para a morbimortalidade da asma é desproporcionalmente elevada^(2;3).

Os consensos atuais recomendam a utilização de corticóide inalatório ou corticóide oral para o controle da inflamação de vias aéreas^(4;5). Pacientes

com asma de difícil controle apresentam sintomas persistentes, a despeito da terapêutica convencional com corticóide e broncodilatador de longa duração.

Atualmente há poucas evidências que orientem o tratamento com novas terapias nesses pacientes. Alguns estudos com biópsia e/ou lavado broncoalveolar em adultos demonstraram que a persistência de inflamação eosinofílica está presente em apenas uma parte desses pacientes^(6;7). Outros estudos sugerem que pacientes portadores de asma de difícil controle apresentariam um perfil inflamatório diferente do observado no quadro histológico clássico, o que poderia implicar uma resposta terapêutica inusitada⁽⁶⁻⁹⁾.

Por outro lado, a demonstração de inflamação eosinofílica persistente em via aérea, apesar do tratamento com corticóide oral, pode indicar a utilização de tratamentos anti-inflamatórios alternativos⁽¹⁰⁻¹²⁾. Ao contrário, na ausência de inflamação eosinofílica, evitar-se-ia a elevada exposição desses pacientes a altas doses de corticóide⁽¹³⁾.

1.1 ASMA DE DIFÍCIL CONTROLE/RESISTENTE AO TRATAMENTO

1.1.1 DEFINIÇÃO

Várias terminologias são utilizadas pelos clínicos quando se referem a um paciente asmático que apresenta uma doença de difícil tratamento: asma crônica grave, asma resistente à terapêutica, asma

resistente ou parcialmente resistente a corticóide, asma quase fatal e asma fatal. O termo asma de difícil controle/resistente à terapêutica é o termo sugerido pela “European Respiratory Society” (ERS) desde a implementação, em 1997, da força tarefa sobre asma de difícil controle/resistente ao tratamento^(3;14).

A força tarefa da ERS define asma de difícil controle/resistente ao tratamento (tratada como asma de difícil controle) em crianças como a persistência de sintomatologia respiratória (sintomas crônicos, frequência de exacerbações, necessidade de broncodilatador de alívio, obstrução de vias aéreas) apesar do tratamento com 800 microgramas de budesonida (ou equivalente) associado a broncodilatador de longa duração^(3;14).

Devido à dificuldade do diagnóstico de asma nos primeiros anos de vida, o termo asma de difícil controle/resistente ao tratamento não deve ser utilizado, de acordo com a força tarefa da ERS, em crianças menores de 5 anos^(3;14;15).

1.1.2 PREVALÊNCIA E IMPACTO DA ASMA DE DIFÍCIL CONTROLE

Acredita-se que 300 milhões de pessoas no mundo sejam asmáticas. Observa-se um aumento marcante da prevalência global da asma especialmente em países ocidentais, de língua inglesa⁽¹⁶⁾. As maiores prevalências de asma foram observadas no Reino Unido, Nova Zelândia, Austrália, Irlanda, Canadá e Estados Unidos⁽¹⁷⁾. Nos EUA, a prevalência de asma aumentou em cerca de 75% de 1980 a 1994, entre todas as raças,

sexos e grupos etários, com o maior aumento no grupo de 0 a 4 anos (160%) e de 5 a 14 anos (74%). Estima-se que uma entre cada dez pessoas é portadora de asma na América do Norte, ou seja, aproximadamente 35 milhões de pessoas⁽¹⁸⁾. No Reino Unido, estudos sugerem que 1 entre cada 7 crianças, com idade entre 2 e 15 anos (1,5 milhões de crianças), apresenta sintomas de asma com necessidade de tratamento⁽¹⁶⁾.

A prevalência e a gravidade da asma em diferentes regiões do mundo foram avaliadas por meio do International Study of Asthma and Allergies in Children (ISAAC). Na América Latina, observou-se uma variabilidade da prevalência da asma entre 1,6 a 36,8%. No Brasil, a prevalência é de 20%, ocupando o 8º lugar dentre os 56 países participantes do ISAAC⁽¹⁹⁾.

Torna-se difícil avaliar a real prevalência da asma de difícil controle em termos mundiais, em parte devido à falta de padronização da definição; dados sugerem, entretanto, que cerca de 5 a 10% dos pacientes sejam portadores de asma de difícil controle^(3;14).

Estima-se que 80% dos recursos destinados ao tratamento da doença são gastos com pacientes portadores de asma grave e de difícil controle. Godard acompanhou, por um período de 12 meses, 318 pacientes portadores de asma leve, moderada, grave e de difícil controle e observou que os gastos relativos aos pacientes com asma de difícil controle superaram em 10 vezes os gastos com pacientes portadores de asma leve, e em 2,5 vezes os gastos com portadores de asma grave⁽³⁾.

Aproximadamente 180.000 pessoas morrem por asma anualmente⁽¹⁶⁾. No Brasil, estudos sugerem um número superior a 2.000 óbitos por asma a

cada ano⁽¹⁹⁾, 70% deles durante hospitalização (2,04/100.000 habitantes). No Estado de São Paulo, a mortalidade no período entre 1993-1995, entre os pacientes de 5 a 34 anos, foi de 0,60/100.000 habitantes.

1.1.3 DIAGNÓSTICO

É essencial que seja realizado o diagnóstico de asma, o qual se baseia principalmente em dados da história clínica do paciente, em evidências fisiopatológicas de reversibilidade de vias aéreas e na exclusão de possíveis diagnósticos que poderiam simular a doença.

Muitas vezes o diagnóstico inicial da asma torna-se difícil, especialmente quando o paciente já está em uso de medicação para o tratamento da asma. Nesse estágio, a resposta ao broncodilatador pode ser pequena e, devido à ausência de marcadores diagnósticos e à inespecificidade dos sintomas, o diagnóstico pode não ser realizado de imediato.

Sugere-se a avaliação do paciente por um período entre seis e doze meses, durante o qual o paciente deverá ser tratado de acordo com os consensos para asma⁽¹⁴⁾. Além disso, fatores como adesão ao tratamento, identificação de fatores de riscos e diagnósticos diferenciais devem ser avaliados.

Ao final desse período, na ausência de resposta ao tratamento, será realizado o diagnóstico de asma de difícil controle.

1.1.3.1 Exclusão de outros diagnósticos

Algumas patologias podem levar a quadros de sibilância (tabela1), simulando um quadro de asma, portanto um paciente com sibilância persistente e ausência de resposta à terapêutica deve ser sempre investigado para possíveis diagnósticos alternativos. Citam-se, entre possíveis diagnósticos diferenciais: bronquiolite obliterante, fibrose cística, discinesia ciliar, imunodeficiências, malformações pulmonares, disfunção de cordas vocais, broncomalácia, corpo estranho, entre outros.

1.1.3.2 Fatores que dificultam o controle da asma

Fatores que dificultam o diagnóstico e/ou controle da asma⁽²⁰⁾, tais como refluxo gastroesofágico^(21;22), exposição a alérgenos, fatores psicosociais, rinite/ sinusite, infecções virais, exposição ao tabaco, dificuldade a acesso médico e, especialmente, adesão ao tratamento devem ser lembrados e tratados antes que o diagnóstico de asma de difícil controle seja realizado.

Refluxo Gastroesofágico

A doença do refluxo gastroesofágico (RGE) é um problema freqüente na população pediátrica. No entanto, embora a associação entre doenças respiratórias e RGE seja bem reconhecida, o significado exato dessa relação e suas implicações clínicas ainda permanecem controversos. Presume-se que o refluxo gastroesofágico (RGE) seja um dos fatores agravantes do

processo asmático. Sua prevalência entre pacientes com asma parece ser variável, com valores entre 25 e 75%⁽²³⁾.

O RGE tem sido apontado por diversos autores como um fator agravante de sintomatologia pulmonar e como responsável pela resposta inadequada ao tratamento medicamentoso. Em recente estudo de Harding et al observou-se alteração na pHmetria em 62% dos pacientes asmáticos estudados, e melhora considerável da sintomatologia respiratória após o tratamento desses pacientes^(22;24). Irwin descreve, dentre os pacientes dos portadores de asma de difícil controle, uma prevalência de 24% de RGE assintomático⁽²⁰⁾. Liou encontrou uma incidência de RGE 2,6 vezes maior em pacientes portadores de asma grave, quando comparados a pacientes com doença leve⁽²⁵⁾. Uma revisão sistemática, entretanto, não evidenciou benefícios no controle da asma ou melhora da função pulmonar após tratamento do RGE em pacientes asmáticos^(26;27).

Parece razoável o tratamento do RGE em pacientes com asma de difícil controle, ainda que mais estudos sejam necessários para estabelecer o valor do tratamento no controle da doença.

Exposição a Alérgenos

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a existência de relações significantes entre o nível de exposição a alérgenos e a gravidade da asma, com aumento na frequência de internação e visitas à unidade de emergência. Alguns autores sugerem que a exposição persistente a alérgenos causa inflamação eosinofílica em vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e resistência secundária ao corticóide^(28;29).

Rinite e Sinusite

Estudos sugerem que asma e rinite freqüentemente coexistem, sendo a rinite, atualmente, reconhecido fator de risco para desenvolvimento e agravamento da asma. Freqüência significativamente maior de sibilância, distúrbio do sono e broncoespasmo induzido por exercício foram observados entre escolares que apresentavam as duas doenças associadas, avaliados pelo questionário escrito do International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). O entendimento de que asma e rinite alérgica são manifestações de um mesmo processo inflamatório, substituindo a idéia de duas distintas entidades, sugere que o tratamento deve contemplar ambas as afecções⁽³⁰⁾.

Infecções do trato respiratório

Infecções virais de vias aéreas têm sido reconhecidas como fatores predisponentes à exacerbações de pacientes asmáticos. Estudos “in vitro” demonstraram um aumento na expressão de mediadores inflamatórios como óxido nítrico, leucotrienos e interleucina 5 (IL 5) na presença de rinovírus e vírus sincicial respiratório⁽³¹⁾. *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* têm sido implicados como agentes associados a aumento na freqüência de exacerbações em pacientes asmáticos^(32;33). Estudos sugerem que o tratamento da *Chlamydia*, com antibióticos macrolídeos, poderia beneficiar os pacientes portadores de asma grave e de difícil controle. A associação desses agentes com a gravidade do quadro clínico em pacientes portadores de asma necessita de maior investigação.

Avaliação da adesão ao tratamento e técnica inalatória

É de extrema importância avaliar a adesão ao tratamento da asma, cuja falta é reconhecida como um dos grandes contribuintes nos casos de asma quase fatal e asma fatal⁽³⁴⁾. A avaliação da adesão ao tratamento permanece difícil de ser realizada em pacientes asmáticos, sendo determinada, muitas vezes, de forma subjetiva, por meio de questionários, avaliação de prescrições médicas ou de pergunta direta ao paciente. O melhor método de avaliação da aderência é a utilização de um monitor computadorizado acoplado ao inalador dosimetrado. Em casos de utilização de drogas como teofilina e corticosteróides, os níveis séricos das drogas podem ser mensurados. Diversos estudos realizados documentaram a baixa adesão dos pacientes asmáticos ao tratamento. Warner JO acompanhou 15.000 crianças inglesas por um período de 12 meses, observando que apenas um sexto dos pais apresentavam prescrição suficiente para tratamento regular dos filhos.

1.1.4 PADRÕES DE ASMA DE DIFÍCIL CONTROLE

Alguns padrões de asma de difícil controle têm sido descritos, evidenciando a heterogeneidade de apresentação clínica desse tipo de asma. Tais padrões são geralmente caracterizados pela frequência de sintomas e exacerbações, início de apresentação do quadro e resposta ao tratamento^(7;34-37). Entre eles citam-se:

“Brittle asthma”: foi inicialmente utilizado para descrever pacientes que apresentavam uma grande variação do pico de fluxo expiratório (PFE), apesar de altas doses do corticóide inalado, com episódios de broncoconstrição pulmonar súbitos e risco de vida. Descrevem-se dois tipos de brittle asma. O tipo 1 é caracterizado por grandes variações do pico de fluxo expiratório e resposta ruim ao broncodilatador. Muitos destes pacientes apresentam problemas de ordem psicológica. O tipo 2 é caracterizado por broncoconstrição pulmonar súbita, função pulmonar normal entre os episódios e asma controlada ou parcialmente controlada. Muitos pacientes apresentam história de alergia alimentar. Os episódios de broncoconstrição pulmonar ocorrem a qualquer hora do dia e sem desencadeante óbvio, com risco de vida para os pacientes, uma vez que são difíceis de prevenir. Os pacientes geralmente apresentam resposta pobre à corticoterapia.

Asma fatal ou quase fatal: pacientes que apresentaram episódio fatal ou quase fatal de asma, com hipercapnia e necessidade de ventilação mecânica. Estudos retrospectivos evidenciaram fatores de risco associados à asma fatal; entre eles, falência respiratória com necessidade de ventilação mecânica, acidose respiratória associada à crise asmática, duas ou mais hospitalizações, apesar do uso crônico de corticóide oral, dois ou mais episódios de pneumotórax ou pneumomediastino associados à crise asmática.

O risco de óbito ainda é mais elevado em pacientes que estejam em uso de três ou mais classes de medicamentos antiasmáticos e apresentam quadro de broncoespasmo súbito com hipoxemia, hipercapnia e queda acentuada da função pulmonar.

Resistência parcial ou dependência ao corticóide: pacientes com obstrução persistente de via aérea, com ou sem episódios de piora súbita, e que necessitam de corticoterapia oral, à qual mostram resposta parcial. Tais pacientes geralmente apresentam sintomas noturnos, intolerância aos exercícios e limitações de vida diária. Esse padrão tende a ser raro em crianças. O grupo de pacientes pode ainda ser subdividido em:

- Asma dependente de corticóide: pacientes que responderiam a corticoterapia, porém em altas doses, estando sujeitos a efeitos colaterais do corticóide.
- Asma resistente a corticóide: pacientes que não respondem à corticoterapia, mesmo em altas doses.

Os mecanismos fisiopatológicos, em crianças portadoras de asma dependente de corticóide e asma resistente a corticóide, ainda não estão bem esclarecidos e há poucas evidências científicas que possam direcionar o tratamento desses pacientes.

As ações antiinflamatórias dos corticóides são mediadas por sua ligação aos receptores (RC) no citoplasma. Uma vez ligados ao receptor, o corticóide sofre mudanças em sua estrutura, as quais resultam em transporte rápido do complexo corticóide/receptor ao núcleo, onde o complexo se liga a seqüências específicas de DNA. Após sua ligação aos receptores no DNA, os corticóides podem aumentar ou inibir a expressão gênica. Os corticóides estimulam a transcrição, como, por exemplo, do receptor beta-2 adrenérgico, da lipocortina-1, da interleucina (IL)-10 e do inibidor de NFkB com ações antiinflamatórias⁽³⁸⁾.

A resistência ao corticóide pode ser primária ou secundária⁽³⁹⁻⁴¹⁾. A resistência primária é rara e decorre da diminuição do número de receptores. A resistência secundária ao corticóide é provavelmente decorrente de diversos mecanismos.

A figura 1 mostra alguns dos mecanismos de resistência ao corticóide (GC). O corticóide é lipofílico e penetra no citoplasma, inicialmente por difusão. O receptor (RC) localiza-se no citoplasma e, após se ligar ao corticóide, penetra no núcleo celular, e se liga a regiões específicas do DNA, conhecidas também como elementos de resposta dos corticóides (GRE).

Uma das formas descritas de resistência é a diminuição da afinidade entre o corticóide e os receptores das células. Essas deficiências de afinidade podem ser devidas ao aumento da expressão da isoforma GR- β , que interfere com a ligação da isoforma ativa GR- α ao GRE, no núcleo celular. Os GR- β estão localizados no núcleo das células, independentemente do tratamento com corticóides. Ao contrário do GR- α , o GR- β não somente é incapaz de ligar-se aos corticóides, como também de ativar genes corticóide-sensíveis. Uma outra forma de resistência é a ligação dos receptores de corticóide a uma proteína, que impede a migração do complexo até o núcleo celular⁽³⁸⁾. É possível, ainda, que o uso crônico de corticóides e a inflamação (determinadas interleucinas como IL2 e IL4 podem diminuir a afinidade corticóide/receptor) presente na via aérea dos pacientes possam levar a uma resistência parcial ao corticóide^(40;41).

Figura 1 - Mecanismos de resistência ao corticóide
(adaptado de Leung D et al 2003)

1.1.5 AVALIAÇÃO DE PORTADORES DE ASMA DE DIFÍCIL CONTROLE

A European Respiratory Society (ERS) sugere um protocolo para investigação em pacientes portadores de asma de difícil controle⁽¹⁴⁾, para um maior entendimento da fisiopatologia e causas da asma de difícil controle (Tabela 1).

O protocolo para avaliação de pacientes torna-se necessário para a padronização da definição tanto de asma de difícil controle/resistente ao tratamento quanto da terapêutica desses pacientes, e para que estudos comparativos possam ser realizados entre diferentes centros.

Tabela 1 - Protocolo para avaliação de pacientes

Avaliação da gravidade

Diário de sintomas e necessidade de broncodilatador de curta duração
Avaliação espirométrica
Variações do pico de fluxo expiratório
Questionário de qualidade de vida
Avaliação de hiperresponsividade brônquica

Determinação da resposta farmacológica

Avaliação da técnica inalatória e adesão
Resposta a broncodilatador
Resposta ao corticosteróide

Radiologia

Radiografia de tórax
Tomografia computadorizada de seios da face
Tomografia computadorizada de tórax de alta resolução

Hematologia

Hemograma completo
Imunoglobulinas totais e subclasses de IgG
IgE total e específica para alérgenos comuns

Outros

Marcadores inflamatórios (óxido nítrico exalado, eosinófilos no escarro)
Teste do suor
pH metria
Nasofibroscopia
Avaliação da estrutura e da função ciliar
Teste cutâneo por punção a alérgenos comuns (prick test)
Broncoscopia com biópsia brônquica e lavado broncoalveolar
Avaliação psicológica

1.1.6 MECÂNICA PULMONAR E HIPERRESPONSIVIDADE BRÔNQUICA

Estudos epidemiológicos sugerem que, evolutivamente, há uma queda acentuada da função pulmonar em indivíduos asmáticos quando comparada a pessoas não asmáticas. A inflamação e a hiperresponsividade brônquica (HRB) são reconhecidas como características principais da asma. A hiperresponsividade brônquica é um comportamento anormal das vias aéreas frente a um estímulo constritor.

Uma das características observadas em pacientes portadores de asma de difícil controle é a presença de broncoconstrição excessiva, com perda do platô de resposta máxima após estímulo broncoconstritor⁽⁴²⁾. Essa redução acelerada no calibre das vias aéreas pode ser decorrente do edema em via aérea, do espessamento da camada muscular lisa e de interações entre o parênquima pulmonar e a via aérea⁽⁴³⁾. Outra característica importante é a ausência de broncodilatação durante a inspiração profunda observada nos pacientes com asma de difícil controle⁽⁴⁴⁾. Essa alteração poderia estar relacionada com o processo inflamatório das vias aéreas e a broncoconstrição excessiva frente a um estímulo constritor, como observado em pacientes com “brittle asma”.

Embora o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) seja utilizado como indicativo de gravidade da doença em pacientes asmáticos, em geral, observa-se uma correlação pobre entre o VEF1 e a gravidade da doença em alguns dos portadores de asma de difícil controle⁽¹⁴⁾. Apesar de a limitação do fluxo aéreo ser uma das alterações fisiológicas observadas nos pacientes com asma de difícil controle, é

bastante provável que outras anormalidades como alterações do recolhimento elástico pulmonar^(44;45), alterações da complacência pulmonar e alterações de pequenas vias aéreas contribuam para explicar a gravidade da doença⁽⁴⁶⁾. A avaliação integrada dessas variáveis poderia, talvez, explicar por que alguns pacientes com maior VEF1 apresentam uma asma de mais difícil controle e/ou resistente ao tratamento, quando comparados a pacientes com VEF1 menor.

1.1.7 INFLAMAÇÃO

A resposta inflamatória é um mecanismo de proteção, desencadeado por vários estímulos. A inflamação é definida como a resposta dos tecidos vascularizados frente a uma agressão, com o propósito de reparar e restaurar o tecido danificado. No entanto, a inflamação crônica, como a inflamação observada em pacientes asmáticos, tem o potencial de levar a alterações estruturais e envolve diferentes tipos de células, além de fibras musculares e endotélio. Essa inflamação pode estar presente tanto em vias aéreas de pacientes com asma leve como nos portadores de asma de difícil controle.

Os mecanismos inflamatórios na asma ocorrem em dois tempos: a fase aguda, que se inicia após a inalação do alérgeno, provocando aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição e aumento da HRB. A fase tardia, que ocorre de quatro a seis horas após a fase aguda, provoca nova obstrução da via aérea, como resultado do efeito de citocinas e de outras substâncias produzidas pelas células inflamatórias.

Figura 2 - Processo inflamatório na asma (modificado do NHLBI 1997)

1.1.7.1 Células inflamatórias na asma

Macrófagos

Os macrófagos são fagócitos mononucleares que derivam da medula óssea, sendo responsáveis pela liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, além de radicais livres e eicosanóides, podendo estar envolvidos no processo de remodelamento

Linfócitos

A maioria dos linfócitos T de pacientes asmáticos é do tipo CD4+ . Os linfócitos T “helper” se dividem em linfócitos: Th1, que secretam preferencialmente IL2 e INF- γ e Th2, que inicialmente produzem IL-4, IL-13 e IL-10 e na seqüência o GM-CSF, IL3, IL5 e IL6. Dados sugerem que a chave na etiologia da doença atópica é a eficiência dos mecanismos que direcionam a resposta imune para o fenótipo Th1. Estudos utilizando o lavado broncoalveolar mostraram uma correlação entre o número de linfócitos na via aérea e a gravidade da doença⁽⁴⁷⁾.

Figura 3 - Predomínio de macrófagos no lavado broncoalveolar em criança sem patologia pulmonar

Eosinófilos

Os eosinófilos são granulócitos derivados da medula óssea. O seu desenvolvimento, diferenciação e liberação na corrente sanguínea são promovidos por, pelo menos, três citocinas: IL-3, IL-5 e GM-CSF⁽⁴⁸⁾.

As proteínas citotóxicas contidas nos grânulos eosinofílicos são: a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e a peroxidase eosinofílica⁽⁴⁹⁾. A ECP é a proteína mais lesiva ao epitélio brônquico e sua presença no LBA, escarro e biópsia faz dela um marcador de atividade eosinofílica. Os eosinófilos liberam mediadores lipídicos, entre eles o PAF, os derivados eicosanóides do ácido araquidônico e leucotrieno, levando a edema da mucosa, broncoespasmo, HRB e secreção de muco⁽⁵⁰⁾. Os eosinófilos podem ser importantes células no processo de remodelamento devido à liberação de fatores de crescimento, elastase e metaloproteases, além de secretar citocinas como IL-2, IL-4 e IL10.

A presença de eosinófilos e seus marcadores de atividade, como a ECP, estão documentados em pacientes portadores de asma⁽⁵¹⁾. Entretanto estudos recentes sugerem que parte dos pacientes portadores de asma de difícil controle não apresentam eosinófilos na via aérea, levantando à possibilidade de, pelo menos, dois fenótipos nesses pacientes: eosinofílico e não eosinofílico⁽⁷⁾.

Neutrófilos

Os neutrófilos são células efectoras em processos inflamatórios agudos e derivam de células da medula óssea por efeito da IL-1, IL-4, e, principalmente, da IL-8. Há evidências crescentes do envolvimento de

neutrófilos no processo inflamatório da asma, especialmente em pacientes portadores de asma noturna, durante crises graves de asma, asma fatal e em portadores de asma de difícil controle^(8;8;9). Produtos dos neutrófilos ativados incluem radicais livres de oxigênio, citocinas e enzimas lesivas aos tecidos, entre elas, a catepsina G e a elastase neutrofílica.

A inflamação neutrofílica na asma de difícil controle formaria a base de um fenótipo que pode estar presente de forma isolada ou em conjunto com a inflamação eosinofílica^(8;9;47;52). Estudos com lavado broncoalveolar em pacientes portadores de asma grave e de difícil controle evidenciaram um aumento do percentual de neutrófilos, além do aumento de IL-8, TGF β e LTB₄^(7;47).

Figura 4 - Neutrófilos no lavado broncoalveolar

Mastócitos

Considerados como células efetoras da alergia imediata, também participam da inflamação crônica. Há duas subpopulações de mastócitos: alguns secretam somente triptase, outros secretam triptase e quimase⁽⁵⁰⁾. A triptase é uma protease com funções pró-inflamatórias, potencializando a contração da musculatura lisa, aumentando a expressão da ICAM-1 pelas células epiteliais e liberando IL-8 com o conseqüente recrutamento de neutrófilos.

Estudos com biópsias brônquicas de pacientes asmáticos demonstram macrófagos em estado ativado. Concentrações elevadas de triptase, histamina e prostaglandina no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos assintomáticos sugerem que a degranulação é constante⁽⁵³⁾.

Células Epiteliais

O epitélio é importante fonte de mediadores pós-inflamatórios como citocinas, quimoquinas, endotelina e fatores de crescimento, entre eles o TGF β . Também possuem ação antiinflamatória pela liberação de IL-10. As células epiteliais liberam peróxido de hidrogênio que estimula a produção de IL-8 e óxido nítrico. O óxido nítrico tem atividade vasodilatadora, broncodilatadora e imunomoduladora em doses baixas, tornando-se, porém, citotóxico em altas concentrações. Na asma ocorre dano epitelial, existindo correlação entre a descamação de epitélio e a HRB⁽⁵⁴⁾. Foi evidenciado aumento de células epiteliais em pacientes portadores de asma de difícil controle.

1.1.8 REMODELAMENTO DA VIA AÉREA

O remodelamento brônquico (RB) é a consequência anatômica da ação da inflamação crônica na via aérea e espelha, além das alterações decorrentes do próprio processo inflamatório, a falta de reparo adequado à injúria crônica^(51;55). Achados histológicos em estudos *pos mortem* foram úteis na caracterização das alterações histológicas das vias aéreas, sendo as alterações mais evidentes em casos de asma fatal. A caracterização dessas alterações compreende: descamação epitelial, espessamento da membrana basal, edema e infiltrado celular inflamatório, espessamento da camada muscular lisa, deposição de colágeno e ruptura das fibras do sistema elástico⁽⁵⁶⁾. A figura 5 mostra o espessamento da membrana basal, o acúmulo de células inflamatórias e a hipertrofia da camada muscular, alterações observadas em pacientes com asma de difícil controle.

Figura 5 - Alterações da via aérea em paciente com asma grave

(Adaptado de Jeffery, P ; Am. J. Respir. Crit. Care Med., Volume 161, Number 5, May 2000, 1720-45)

Estudos revelam que a asma está associada com perda acelerada de função pulmonar, se comparada com a de indivíduos normais⁽⁵⁷⁾. Acredita-se que as alterações estruturais poderiam contribuir para as alterações funcionais irreversíveis⁽⁵¹⁾.

A inflamação crônica e o remodelamento parecem ocorrer paralelamente e acontecem inclusive na asma leve; no entanto a magnitude dessas mudanças parece estar associada com a gravidade da doença. São necessários mais estudos para se conhecer o grau de dependência do processo inflamatório crônico e a velocidade com que o remodelamento se desenvolve, porém estudos recentes mostram que a intervenção terapêutica precoce pode retardar ou prevenir o desenvolvimento de obstrução irreversível da vias aéreas^(58;59).

1.1.9 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

A presença de inflamação crônica nas vias aéreas de pacientes asmáticos já está bem estabelecida, sendo considerada importante, e pode estar relacionada com a persistência e a gravidade da doença⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾. Diferentes fenótipos de asma têm sido propostos, sugerindo-se que subtipos inflamatórios estariam associados com características clínicas, funcionais e fisiológicas distintas^(7;46;61).

A inflamação das vias aéreas pode ser avaliada por diferentes métodos invasivos ou menos invasivos. Dentre os métodos considerados menos invasivos, citam-se o óxido nítrico exalado e o escarro induzido^(10;62;63).

Níveis elevados de óxido nítrico estão presentes no ar expirado de pacientes asmáticos. A estimulação de macrófagos alveolares resulta na liberação de citocinas que estimulam o epitélio brônquico, causando maior produção de óxido nítrico. A avaliação do óxido nítrico pode ser obtida “on line” (exalação em um circuito direto para o analisador com leitura imediata) ou “off line” (coleta em um balão com leitura tardia).

O escarro induzido representa um método pouco invasivo, seguro, prático e reprodutível. Pode ser obtido em qualquer idade, sendo a indução por solução salina hipertônica geralmente bem sucedida em 60 a 85% dos adultos e crianças com asma. O escarro induzido contém uma proporção maior de neutrófilos, além de concentrações mais elevadas de ECP, triptase e fibrinogênio quando comparadas aos valores obtidos no LBA^(64;65). O escarro induzido avalia a inflamação existente em vias aéreas de grande calibre, não representando as vias aéreas distais.

Em estudo recente observou-se uma correlação entre o percentual de eosinófilos no lavado broncoalveolar e no escarro de crianças portadoras de asma de difícil controle⁽⁶²⁾. Observou-se ainda uma correlação entre o percentual de eosinófilos no LBA e os valores de óxido nítrico nesses pacientes (Figura 6). Esse mesmo estudo sugere que a presença de eosinófilos no escarro pode prever razoavelmente a presença de eosinófilo no LBA (valor preditivo positivo=75%). Entretanto a ausência de eosinófilos no escarro não é um bom indicador de ausência de inflamação eosinofílica no LBA (valor preditivo negativo=63%). Observou-se, ainda, uma correlação entre o percentual de eosinófilos no LBA e os valores de óxido nítrico nesses pacientes.

Figura 6 - Correlação entre eosinófilos no LBA versus eosinófilos no escarro e eosinófilos no LBA versus óxido nítrico

Por serem métodos pouco invasivos e de fácil realização, seria preferível a utilização de métodos como a medida do óxido nítrico e o escarro induzido para a avaliação das vias aéreas de crianças portadoras de asma grave. Entretanto, até o momento, os estudos comparativos entre métodos invasivos e não invasivos vem apresentando diferenças quantitativas entre marcadores inflamatórios, celulares e não celulares, nos pacientes portadores de asma de difícil controle, provavelmente por representarem diferentes compartimentos da via aérea^(62;65).

Os métodos considerados invasivos na avaliação da inflamação da via aérea incluem a broncoscopia com biópsia brônquica⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾ e lavado broncoalveolar^(69;70).

Payne et al realizaram broncoscopia com biópsia endobrônquica em 38 crianças com asma de difícil controle sem evidência de complicações durante ou após o procedimento⁽⁶⁷⁾. A biópsia reflete as vias respiratórias proximais e não representa as alterações de pequenas vias aéreas. Existem

poucas comparações entre biópsia brônquica e marcadores não invasivos em pediatria. Estudo recente avaliou 27 crianças portadoras de asma de difícil controle, não encontrando correlação entre as células inflamatórias do escarro e da biópsia endobrônquica⁽⁶²⁾.

Figura 7 - Correlação entre eosinófilos no escarro versus eosinófilos na biópsia brônquica

O lavado broncoalveolar representa as vias aéreas proximais, distais e o espaço alveolar. Após a padronização das técnicas para coleta e processamento do LBA, diversos estudos têm sido realizados, tendo o lavado broncoalveolar em muito acrescentado aos conhecimentos fisiopatológicos da asma de difícil controle^(69;71-74).

Stevenson et al estudaram 52 crianças asmáticas e observaram um percentual de eosinófilos elevado no LBA de pacientes asmáticos, quando comparado a crianças com quadro de sibilância associada a processos virais.

Outros estudos também observaram um aumento de eosinófilos no lavado de crianças asmáticas, quando comparado a crianças não sibilantes,

além de níveis elevados de ECP, mesmo quando essas crianças se encontravam assintomáticas, sugerindo que crianças atópicas possuem eosinófilos ativados mesmo na ausência de sintomas^(75;76).

Em recente estudo, Wenzel et al observaram a presença de dois padrões inflamatórios no LBA de adultos portadores de asma de difícil controle: eosinofílico e não eosinofílico^(7;77). De Blic et al avaliaram 28 crianças portadoras de asma de difícil controle e encontraram uma associação entre presença de eosinófilos ativados e inflamação do tipo Th2, enquanto pacientes assintomáticos apresentavam aumento de INF γ no LBA, sugerindo um padrão do tipo Th1 nesses pacientes⁽⁴⁷⁾.

Marguet et al examinaram o LBA de 72 crianças portadoras de asma, tosse crônica e fibrose cística, observando um aumento de eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais nas crianças com asma. Observaram ainda uma correlação entre neutrófilos e a gravidade dos sintomas⁽⁷⁸⁾.

Figura 8 - Correlação entre sintomas e células do LBA

Recentemente vários autores têm descrito diferentes padrões inflamatórios em pacientes portadores de asma de difícil controle, com predomínio de neutrófilos, sugerindo um papel importante dos neutrófilos na inflamação da via aérea desses indivíduos^(8;9;52;79;80). Estudos sugerem a existência de diferentes fenótipos, com resposta pobre ao corticóide naqueles pacientes com predomínio de neutrófilos no LBA e biópsia⁽⁸⁰⁾.

Entretanto não se sabe ao certo se a presença de neutrófilos na via aérea representaria um diferente fenótipo ou se seria secundário ao uso crônico de corticoterapia, uma vez que o corticóide prolonga a meia vida do neutrófilo, reduzindo a apoptose celular.

Figura 9 - Neutrófilos e Inflamação

1.1.9.1 Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar permite uma análise das células inflamatórias em uma extensão muito maior do que métodos como escarro induzido e biópsia endobrônquica. O uso da broncoscopia flexível para a obtenção do lavado broncoalveolar foi popularizado pelo Dr Helbert Reynolds, e o LBA vem sendo, desde então, amplamente utilizado na investigação de patologias respiratórias. Minimamente invasivo, seguro e geralmente bem tolerado, o lavado broncoalveolar (LBA) tornou-se parte importante da investigação de diversas patologias pulmonares. Após a publicação das normas da ERS referentes à padronização da coleta e do processamento⁽⁶⁹⁾, o LBA vem sendo utilizado, com maior frequência, para análise de componentes celulares e não celulares relacionados ao processo inflamatório presente nas vias aéreas de pacientes portadores de asma de difícil controle.

Os aspectos técnicos da coleta e processamento do lavado broncoalveolar são extremamente importantes e resultados controversos na interpretação do lavado podem ser decorrentes das diferentes técnicas de realização do LBA. Embora ainda não haja um consenso universal sobre a metodologia ideal, esforços mundiais têm sido feitos na tentativa de padronização da coleta e interpretação do lavado broncoalveolar. Em 1996, surgiu uma força tarefa na Europa, sugerindo recomendações, indicações e valores normais do LBA para a faixa etária pediátrica^(69;73;74).

Coleta

Em pacientes pediátricos o lavado broncoalveolar é geralmente realizado por meio de broncoscópio flexível com um diâmetro externo geralmente entre 3,5-3,7 mm^(66;69).

Existem algumas controvérsias quanto ao volume a ser infundido, contudo diversos trabalhos sugerem que o volume deva ser ajustado ao peso corpóreo, utilizando-se 3 alíquotas de 1 ml por quilo de peso^(69;71). A aspiração do fluido deve ser realizada com a menor pressão possível, na tentativa de minimizar o colapso de vias aéreas distais. A princípio, o LBA deve ser realizado na área mais acometida do parênquima pulmonar, ou, em doenças difusas, deve ser realizado no lobo médio⁽⁷²⁾.

Processamento e Citologia do Lavado Broncoalveolar

A citologia do LBA é a análise do componente celular da amostra. Não há um consenso se a primeira amostra do lavado deve ser processada separadamente ou em conjunto com as demais amostras⁽⁸¹⁾. A primeira amostra é especialmente interessante em doenças com comprometimento brônquico, como a asma, e contém proporcionalmente mais neutrófilos e menos linfócitos do que as amostras seguintes. Sugere-se que parte da primeira amostra seja enviada para microbiologia⁽⁶⁹⁾.

O processamento do LBA em crianças não difere do processamento em adultos. O volume de lavado recuperado deve ser anotado e a contagem total de células deve ser realizada. A citologia diferencial é geralmente realizada por citocentrifugação e a coloração pode ser obtida utilizando-se

corantes como May-Grunwald Giemsa e Diff Quick. Sugere-se a contagem de pelo menos 300 células.

Fluido da Camada Epitelial

Não há, até o momento, um marcador confiável para o cálculo da fração de líquido epitelial recuperada durante a realização do lavado broncoalveolar. Nenhum dos métodos, como azul de metileno, albumina e uréia mostraram-se adequados⁽⁶⁹⁾. Altas concentrações de uréia e albumina foram observadas no LBA de crianças, fato que pode ser decorrente do aumento da permeabilidade alveolo-capilar observada em crianças ou da utilização de maiores pressões negativas durante a coleta do lavado.

Sedação

Em crianças é realizado sob anestesia geral. As drogas preferencialmente utilizadas têm sido aquelas com meia vida curta e capazes de induzir amnésia anterógrada como midazolam, fentanil ou propofol^(82;83).

Contra-indicações

Dentre as contra-indicações relativas à realização do LBA citam-se: VEF1 < 60%, PaO₂ <60 mmHg, doença cardíaca, SaO₂ <90%, plaquetas abaixo de 20.000, coagulopatias e infiltrado pulmonar extenso (>50% da área pulmonar). No entanto os riscos e benefícios do procedimento devem ser avaliados individualmente⁽⁶⁹⁾.

Complicações

O LBA pode causar aumento do tempo de broncoscopia em cerca de 2 a 3 minutos, discreta hipercapnia e/ou hipoxemia⁽⁸⁴⁾. Tem sido realizado com segurança em pacientes com plaquetas acima de 20.000, porém o risco de sangramento é hipoteticamente maior em pacientes com coagulopatias. Pode ocorrer febre baixa e transitória, estando diretamente relacionada com o volume de solução infundido^(85;86).

Segurança

O LBA deve ser realizado rotineiramente sob monitorização contínua. Deve-se ter acesso fácil a equipamentos de ressuscitação, oxigênio e antagonistas dos agentes sedativos (naloxano e flumazenil). A limpeza e desinfecção apropriadas são mandatórias na prevenção de infecções cruzadas. Desde que sejam obedecidas as normas básicas de segurança, é um procedimento extremamente seguro, existindo apenas um relato, em toda literatura, de um paciente que evoluiu a óbito decorrente de edema pulmonar e choque séptico após a realização do lavado broncoalveolar⁽⁸⁶⁾.

Valores normais em pacientes pediátricos: componentes celulares

As questões éticas envolvendo a realização do LBA em crianças dificultam a obtenção de valores de referência, na faixa etária pediátrica, em grandes casuísticas^(73;74;87;88). Alguns dos resultados obtidos por estudos realizados em crianças sem doença no parênquima pulmonar, que foram

submetidas à broncoscopia por indicações como estridor, corpo estranho ou durante cirurgia eletiva, estão especificados na tabela 2.

Tabela 2 - Celularidade do lavado broncoalveolar em crianças

	Ratjen et al⁽⁷³⁾	Riedler et al.⁽⁸⁸⁾	Heaney & Clement⁽⁸⁷⁾
N	48	18	11
Faixa etária	3-6 anos	1 mês-10 anos	1-15 anos
Número/alíquotas	3	3	6
X10 ⁴ células/ml (mediana)	7.3	15.5	24
%macrófagos (mediana)	84	91	89
%linfócitos (mediana)	10	12	7
%eosinófilos (mediana)	0.2	0.2	0
%neutrófilos (mediana)	0.9	1.7	3.5

Apesar das variações entre os diferentes estudos, a celularidade total e o diferencial celular obtido em crianças são similares ao que se observa em adultos^(72-74;85). O volume total recuperado de LBA é cerca de 50-70% do volume instilado de solução salina fisiológica. Há predomínio de macrófagos (>80%), seguido dos linfócitos. Considera-se aceitável em crianças um percentual de neutrófilos menor do que 4% e um percentual de eosinófilos inferior a 3%. De modo geral, considera-se aceitável a presença de até 5% de células epiteliais no lavado alveolar^(73;74;87;88).

A utilização da broncoscopia e a realização de exames como a biópsia pulmonar e o lavado broncoalveolar (LBA) em muito acrescentaram aos conhecimentos fisiopatológicos da asma de difícil controle^(6;14;35;69;79;89).

Wenzel et al avaliaram 34 adultos portadores de asma de difícil controle e observaram um aumento significativo de neutrófilos no LBA em pacientes portadores de asma de difícil controle, quando comparados a pacientes portadores de asma leve/moderada. Tillie Leblond (2000) realizou lavado brônquico em 14 pacientes adultos em crise de asma grave, demonstrando um afluxo intenso de neutrófilos e aumento importante de elastase neutrofílica quando comparados com indivíduos portadores de asma controlada⁽⁹⁰⁾.

Devido a aspectos éticos, estudos em crianças são raros. Pouco se conhece, em crianças portadoras de asma de difícil controle, a correlação entre os padrões inflamatórios e aspectos clínicos e fisiológicos.

Tradicionalmente a asma é definida como uma doença inflamatória crônica de vias aéreas, mediada por linfócitos Th2, com presença de eosinófilos em vias aéreas e resposta adequada a corticoterapia.

Entretanto, admite-se que cerca de 50% dos pacientes portadores de asma de difícil controle apresentariam um perfil inflamatório diferente do observado no quadro histológico clássico, ou seja, admite-se hoje a existência de diferentes fenótipos^(6;8;11;52;91).

Barbato, por meio de estudo retrospectivo, analisou 29 pacientes (13 asmáticos e 16 controles) demonstrando aumento de mieloperoxidase, proteína catiônica e neutrófilos no lavado broncoalveolar do grupo portador de asma, quando comparado ao grupo controle⁽⁹²⁾. De Blic avaliou 28 crianças portadoras de asma de difícil controle, separando-as em dois grupos distintos (grupo S - crianças que necessitaram de 3 ou mais

internações e/ou que necessitavam de medicação de alívio com frequência maior de 3 vezes por semana - e grupo NS - pacientes mais estáveis). Níveis elevados de proteína catiônica eosinofílica e aumento do percentual de eosinófilos foram detectados no lavado broncoalveolar dos pacientes considerados sintomáticos⁽⁴⁷⁾.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi descrever o perfil de células inflamatórias do lavado broncoalveolar em crianças e adolescentes com asma de difícil controle correlacionando-os com parâmetros clínicos e funcionais da doença.

3. MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO

Foram estudadas 24 crianças portadoras de asma de difícil controle (Tabela 3) em acompanhamento na unidade de pneumologia pediátrica do Royal Brompton&Harefield Hospital, Londres. A definição de asma de difícil controle utilizada foi baseada na força tarefa da ERS. Foram definidos como asma de difícil controle aqueles pacientes que apresentaram sintomatologia persistente, apesar do tratamento com 800mcg de budesonida (ou dose equivalente de outro corticóide inalado) e broncodilatador de longa duração. Os 24 pacientes foram incluídos em um protocolo para asma de difícil controle, tendo recebido 40 mg de prednisolona via oral em dose única, diária, por duas semanas, antes da realização do lavado broncoalveolar, como parte desse protocolo.

3.2 CONTROLES

O lavado broncoalveolar foi realizado em 5 crianças sem diagnóstico clínico de asma, submetidas à broncoscopia por outras indicações clínicas (3 crianças foram submetidas à broncoscopia para investigação de malformação da árvore brônquica e/ou malformação vascular e 2 crianças

para avaliação de estridor). A broncoscopia e o lavado broncoalveolar foram realizados após consentimento dos pais ou responsáveis.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Crianças e adolescentes na faixa etária pediátrica de 5 a 17 anos, portadores de asma de difícil controle, conforme definição da força tarefa européia.
- Ausência de evidências clínicas de infecção respiratória aguda nos últimos 30 dias.
- Concordância em participar do estudo por um dos responsáveis, após assinatura do consentimento informado livre e esclarecido (anexo B)

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Evidências clínicas de infecção respiratória aguda nos últimos 30 dias.
- Imunofluorescência positiva para vírus respiratório ou cultura do LBA positiva para bactérias (maior ou igual a 10^5 unidades formadoras de colônias por ml de LBA).
- Pacientes portadores de patologias associadas, como cardiopatia e coagulopatias.
- Saturação de oxigênio menor de 90%.

3.5 PROTOCOLO DE ASMA DE DIFÍCIL CONTROLE

Os 24 pacientes foram incluídos em um protocolo para asma de difícil controle, desenvolvido pela unidade de pneumologia pediátrica do Royal Brompton Hospital (RBH). O protocolo foi desenvolvido com o objetivo de se determinar uma melhor abordagem dos pacientes portadores de asma de difícil controle, baseando-se na hipótese de que existem diferentes razões para a ausência de resposta ao tratamento. Um segundo objetivo do protocolo foi avaliar a função pulmonar assumindo que, após 15 dias de doses elevadas de corticoterapia oral e após broncodilatador (VEF1 pós broncodilatador, pós corticoterapia), os melhores valores funcionais para cada criança poderiam ser obtidos.

O protocolo foi desenvolvido entre o que se aceita ser cientificamente ideal e o que se considera eticamente possível. Os pacientes eram encaminhados ao ambulatório de asma de difícil controle, quando, na persistência de sintomatologia apesar do tratamento adequado, outros possíveis diagnósticos e fatores complicadores da asma tivessem sido excluídos e/ou tratados. Testes de rotina dessas crianças incluíam: radiografia de tórax, tomografia computadorizada de tórax, teste do suor, escovado nasal para avaliação da motilidade e estrutura ciliar, óxido nítrico nasal, pHmetria, hemograma e coagulograma, avaliação de imunodeficiência. Quando julgado necessário, essas crianças eram avaliadas pelo serviço de psicologia infantil do RBH e pelo serviço de otorrinolaringologia. Todas as crianças foram acompanhadas pela equipe de enfermagem do ambulatório

de asma da unidade de pneumologia pediátrica para acompanhamento e avaliação da adesão ao tratamento. Sendo diagnosticadas como portadoras de asma de difícil controle, eram convidadas a participar do protocolo de asma de difícil controle.

Na primeira visita, realizavam-se uma consulta para explicação do protocolo, orientações sobre o preenchimento do diário de sintomas, avaliação espirométrica e avaliação da equipe de enfermagem.

Na segunda visita foram realizados: avaliação clínica do paciente, testes não invasivos para avaliação da inflamação em vias aérea (óxido nítrico exalado, escarro induzido), espirometria, solicitação e orientação do preenchimento do diário de sintomas (necessidade do uso de broncodilatador de alívio e os dias livres de sintomatologia). Na ausência de sinais clínicos de infecção de vias aéreas, era iniciada corticoterapia oral, 40mg de prednisolona via oral, uma vez ao dia, por 15 dias.

Na terceira visita, 15 dias após a segunda visita, foram realizados: avaliação clínica do paciente, testes não invasivos para avaliação da inflamação em vias aérea (óxido nítrico exalado, escarro induzido), espirometria, broncoscopia com biópsia endobrônquica e lavado broncoalveolar, coleta de sangue e dosagem sérica de níveis de cortisol.

Não foi objetivo desse estudo a análise dos demais testes realizados no protocolo.

Figura 10 - Protocolo de asma de difícil controle

3.6 BRONCOSCOPIA

A broncoscopia foi realizada em 24 pacientes e 5 controles, sob anestesia geral, utilizando-se máscara laríngea por meio de um broncoscópio flexível (Olympus) com diâmetro entre 3,2 a 4,9 mm. Na maioria dos pacientes o anestésico utilizado foi o propofol e mais um agente inalatório (sevoflurano), em doses habituais.

3.7 LAVADO BRONCOALVEOLAR

O mesmo protocolo do lavado broncoalveolar foi realizado em todos os pacientes e nos controles.

Coleta: O lavado broncoalveolar foi colhido no lobo médio, sob anestesia geral, utilizando-se 3 alíquotas de 1ml por quilo de peso corpóreo de solução salina pré-aquecida. O volume recuperado do LBA foi anotado e uma amostra foi enviada à microbiologia.

Processamento: O lavado foi centrifugado a 1500 rpm a uma temperatura de 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 4 ml de meio essencial mínimo (MEM), com Hepes e sem L-glutamina (Invitrogen, United Kingdom). O número total de células foi obtido utilizando-se uma câmara de Neubauer e os resultados expressos em número de células por ml de lavado.

Citocentrifugação: As células foram ressuspensas e citocentrifugadas por 2 minutos, a 500 rpm. Foram feitas quatro lâminas para cada paciente, sendo duas lâminas coradas com May-Grünwald e Giemsa para contagem diferencial de células. As porcentagens de cada tipo celular foram determinadas contando-se 500 células. A viabilidade celular foi analisada utilizando-se azul de triptano.

Microbiologia: Culturas quantitativas foram realizadas em meio seletivo, na rotina do laboratório de microbiologia. Cultura com valor igual ou maior a 10^5 unidades formadoras de colônias por ml de LBA foi considerada positiva, de acordo com as orientações da força tarefa para lavado

broncoalveolar da Sociedade Europeia de Doenças Respiratórias. Imunofluorescência direta foi realizada na amostra do lavado broncoalveolar, utilizando-se anticorpos monoclonais contra vírus sincicial respiratório (VSR), influenza A e B, parainfluenza 1,2,3 e adenovírus.

Figura 11 - Técnica de Coleta e Processamento do LBA

3.8 COLETA DE SANGUE

Foi realizada coleta de sangue antes do início da broncoscopia, para a realização de leucograma, IgE específica para epitélio de gato, epitélio de cachorro, , fungos e gramíneas e dosagem dos níveis de cortisol. A adesão ao corticóide foi considerada satisfatória na presença de níveis de cortisol inferiores a 100 nM.

3.9 GRAVIDADE DO QUADRO CLÍNICO

A correlação entre as células inflamatórias no lavado broncoalveolar e a sintomatologia clínica foi avaliada utilizando-se os seguintes parâmetros clínicos: o número de internações hospitalares nos últimos 12 meses, a necessidade do uso de broncodilatador de alívio duas semanas antes do lavado broncoalveolar (apesar do uso de doses altas de corticoterapia sistêmica), VEF1 pós-broncodilatador pós-corticoterapia sistêmica, obtido no dia da broncoscopia (com o intuito de se obter o melhor VEF1 de cada paciente pós-terapêutica com corticóide) e número de cursos de prednisolona nos últimos 12 meses.

3.10 FUNÇÃO PULMONAR

A espirometria foi realizada, de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Tórax (ATS), no laboratório de função pulmonar do Royal Brompton & Harefield Hospital, Londres, utilizando-se um espirômetro portátil (Compact Vitalograph Ltd., Buckingham, UK). Todas as provas foram realizadas por um único examinador, no período da manhã, antes da realização da broncoscopia. Consideramos obstrução, valores de volume expiratório forçado no primeiro segundo, pós-broncodilatador (VEF1 pós BD) <80% do predito.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Testes não paramétricos foram utilizados. As correlações foram realizadas por meio do teste de Spearman. A comparação entre controles e pacientes com asma de difícil controle foi realizada, utilizando-se o teste de Mann Whitney. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.12 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Royal Brompton Hospital. O consentimento informado foi utilizado para realização da pesquisa (anexo C e D), juntamente com a aprovação do chefe do

serviço de Pneumologia Pediátrica para a apresentação dos dados coletados. Uma cópia da aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Royal Brompton Hospital foi enviada à comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP e a Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança (anexo E e F).

O projeto de pesquisa foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (anexo G).

4. RESULTADOS

As características clínicas das 24 crianças com asma de difícil controle estão listadas na tabela 3. Os resultados da função pulmonar (volume expiratório forçado no primeiro segundo, pós broncodilatador) realizadas antes da broncoscopia também são mostrados. Quatorze dos vinte e quatro pacientes (60%) apresentaram volume expiratório forçado no primeiro segundo, pós broncodilatador (VEF1 pós BD) < 80%.

Tabela 3 - Características do pacientes

N	24
Idade, mediana (variação)	13 (5-14)
Tempo da doença, mediana (variação)	6.5 (2-12)
Atopia	21/24 (88%)
IgE sérica, mediana (variação)	470 (19-5014)
FEV ₁ pós broncodilatador (% predito)	76% (49-116)
Broncodilatador de longa duração, n	23
salmeterol, n	19
formoterol, n	4
Dose de corticóide inalatório, mediana (equivalente a budesonida) (µg/day)	1500 (800-2500)
Budesonida, n	6
Fluticasona, n	18
Internações nos últimos 12 meses, mediana (variação)	4 (0-10)
Número de cursos de corticóide nos últimos 12 meses, mediana (variação)	5 (1- 12)
Pacientes em uso diário de corticóide, n	4
Pacientes em uso em dias alternados, n	6

A broncoscopia foi bem tolerada, sem complicações. Os resultados do LBA encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do lavado broncoalveolar em 24 pacientes com asma de difícil controle tratados com prednisolona comparado aos controles

	Valores publicados para crianças normais (73;74;88) mediana (variação)	Grupo controle do estudo mediana (variação)	Pacientes com asma de difícil controle mediana (variação)	P value [#]
Número de pacientes	18	5	24	
Idade		9 (4-14)	13 (5-14)	0.48
Volume infundido	3ml/kg	3ml/kg	3ml/kg	
Número de alíquotas	3	3	3	
Vol. LBA recuperado %	62.5 (42.5-71.5)	70.0 (50.0-76.9)	56.4 (33.3-68.7)	0.02
Número de células/ml LBA ($\times 10^4$):				
Nº Total de Células	15.5 (7.5-25.8)	11.0 (9.0-30.0)	13.5 (6.0-42.0)	0.97
Macrófagos	-	9.5 (7.6-24.0)	9.1 (4.2-18.2)	0.50
Linfócitos	-	1.5 (0.6-3.6)	1.1 (0.4-6.4)	0.82
Neutrófilos	-	0.1 (0.06-1.9)	0.5 (0.1-18.0)	0.10
Eosinófilos	-	0.06 (0-0.4)	0.2 (0-1.4)	0.20
Mastócitos	-	0 (0)	0 (0-0.1)	0,59
Células Epiteliais	-	0 (0-0.7)	0.4 (0-2.0)	0.03
Diferencial do LBA				
Macrófagos %	91 (84.2-94)	80.0 (73.0-87.0)	74.0 (42.0-88.0)	0,14
Linfócitos %	7.5 (4.7-12.8)	12.0 (6.0-25.5)	8.2 (3.0-36.0)	0,52
Neutrófilos %	1.7 (0.6-3.5)	1.5 (0.5-7.0)	6.2 (0.5-43.0)	0,07
Eosinófilos %	0.2 (0-0.3)	0.5 (0-1.0)	1.5 (0-18.5)	0,15
Mastócitos %	-	0 (0)	0 (0-0.5)	0,64
Células Epiteliais%	-	0 (0-6.5)	3.0 (0-10.0)	0,15

[#] Mann Whitney U teste, pacientes com asma grave comparados aos controles.

Evidência de adesão satisfatória à prednisolona foi obtida em 21 crianças. Em três crianças não foi possível, por razões de ordem técnica, a obtenção dos valores de cortisol. Esses pacientes foram incluídos no estudo. Apesar da ausência de evidência laboratorial da adesão ao uso de corticoterapia, os pacientes foram considerados aderentes ao tratamento, em virtude do acompanhamento rigoroso realizado pela equipe médica e de enfermagem do ambulatório de asma de difícil controle.

Os pacientes apresentaram imunofluorescência negativa para vírus respiratório no LBA e cultura negativa para bactérias. O número de células por ml de LBA (mediana 13.5×10^4 , variação $6-42 \times 10^4$) foi similar ao encontrado no grupo controle do estudo ($p=0,97$) e similar aos dados publicados na literatura para controles. Observou-se, no grupo de estudo, uma diminuição do número de macrófagos (mediana 74%, variação 42-88%) em decorrência, principalmente, do aumento de neutrófilos (mediana 6,25%, variação 0,5%-43%). Quinze dos vinte e quatro pacientes (60%) apresentaram aumento do número de neutrófilos no LBA (mediana 15%, variação 5-43%). Observou-se, em cinco pacientes (20%), aumento de eosinófilos (mediana 9%, variação 6,5-18.5%).

Figura 12 - Aumento do percentual de eosinófilos no lavado broncoalveolar de criança portadora de asma de difícil controle

Em cinco das 24 crianças (20%), não se observou a presença de células inflamatórias. Apenas uma das crianças apresentou aumento tanto no número de eosinófilos quanto neutrófilos no lavado broncoalveolar. O volume de LBA aspirado foi, nas crianças com asma grave tratadas com prednisolona, significativamente inferior ao obtido no grupo controle ($p=0,02$).

Os dados disponíveis mostram que a maioria das crianças eram atópicas (21/24, 88%). Houve correlação entre o número de alérgenos no RAST e a idade dos pacientes ($r_s 0.52$, $p=0.01$). Aumento no número total de leucócitos foi observado em 56% dos pacientes. Observou-se um aumento no número de neutrófilos periféricos em 44% dos pacientes.

Nos 12 meses precedentes ao estudo, 10/24 pacientes (41%) receberam prednisolona diária ou em dias alternados. Estes pacientes receberam uma média de 4 cursos de corticóide nos 12 meses anteriores ao estudo (1-12 cursos de corticóide/12 meses). Os pacientes que não estavam em uso diário ou em dias alternados de corticóide oral (14/24; 59%) também receberam, em média, 4 cursos de corticoterapia oral no último ano (2-12 cursos de corticóide/12 meses). Pacientes com maior percentual de eosinófilos no LBA necessitaram de um maior número de cursos de corticóide nos 12 meses que precederam o estudo (% rs 0.55, $p=0.005$).

Quatorze dos vinte e quatro pacientes (60%) necessitaram de pelo menos 4 internações no último ano. Duas crianças necessitaram de cuidados intensivos, apesar do uso de corticoterapia em dias alternados. Observou-se uma correlação entre o número de internações nos 12 meses anteriores ao estudo e o aumento de eosinófilos no LBA (% rs 0.52, $p=0.009$). Pacientes que necessitaram de um maior número de internações apresentaram maior necessidade de broncodilator de alívio (rs 0.68, $p=0.02$).

Figura 13 - Correlação entre o número de internações nos 12 meses anteriores ao estudo e o percentual de eosinófilos no LBA

Testes de função pulmonar realizados anteriormente ao LBA evidenciaram que mais da metade dos pacientes (13/22; 59%) apresentaram redução do VEF1 pos-broncodilatador (49-79%), apesar do uso de altas doses de corticoterapia oral nos 15 dias que precederam o estudo. A mediana de VEF1 pós-BD foi de 76% (46-116%) no grupo de 24 crianças. Observou-se uma tendência entre o aumento do número de neutrófilos no lavado broncoalveolar e uma pior função pulmonar nos pacientes com asma de difícil controle (ml: $rs -0.43$, $p=0.07$, %: $rs -0.37$, $p=0.08$).

Houve uma correlação significativa entre a função pulmonar e a idade dos pacientes ($r_s -0.56$, $p=0.007$), e número de alérgenos positivos no RAST teste ($r_s -0.46$, $p=0.03$).

Houve uma correlação significativa entre a função pulmonar e a idade dos pacientes ($r_s -0.56$, $p=0.007$), e número de alérgenos positivos no RAST teste ($r_s -0.46$, $p=0.03$). A figura 14 mostra a correlação entre a função pulmonar e a idade das crianças.

Figura 14 - Correlação entre a função pulmonar (VEF1 pós broncodilatador) e a idade dos pacientes

Tabela 5: Correlação entre o LBA e os parâmetros clínicos

	Número de internações nos últimos 12 meses	Número de cursos de corticóide nos últimos 12 meses	FEV ₁ pós broncodilator (% predito) antes do LBA
Células /ml LBAx 10 ⁴ :			
Total de células	0.63	0.12	0.46
macrófagos	0.10	0.90	0.84
linfócitos	0.56	0.66	0.65
neutrófilos	0.50	0.53	0.07* (r² -0.43)
eosinófilos	0.04* (r² 0.47)	0.02 (r ² 0.52)	0.95
mastócitos	0.39	0.39	0.82
Cel. epiteliais	0.27	0.12	0.43
Diferencial celular			
macrófagos %	0.002* (rs -0.61)	0.001	0.10
linfócitos %	0.23	0.25	0.72
neutrófilos %	0.37	0.32	0.08* (r² -0.37)
eosinófilos %	0.009* (r² 0.52)	0.005 (r ² 0.55)	0.73
mastócitos %	0.39	0.52	0.82
Cel. epiteliais %	0.37	0.01	0.15

5. DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A casuística deste estudo foi constituída de pacientes portadores de asma de difícil controle, encaminhados a um centro de referência para o qual são drenados os casos mais graves da doença. Estima-se que, atualmente, cem crianças portadoras de asma de difícil controle estejam em acompanhamento nesse serviço.

Este estudo é parte de um protocolo que tinha como principal objetivo definir não somente os possíveis mecanismos responsáveis pela ausência de resposta ao tratamento observada nesses pacientes, mas também definir um plano de tratamento adequado a essa população.

Por meio do lavado broncoalveolar foi possível caracterizar diferentes perfis inflamatórios nesse grupo de pacientes. Nós demonstramos que a maioria das crianças portadoras de asma de difícil controle (60%) apresentou um aumento importante do número de neutrófilos no lavado broncoalveolar. Um pequeno percentual de pacientes apresentou persistência do padrão eosinofílico (5/24; 20%), apesar do uso de corticoterapia oral em altas doses; outros (5/24; 20%) apresentaram ausência de sinais inflamatórios no lavado broncoalveolar.

Uma importante consideração a se fazer é o aspecto da celularidade do lavado broncoalveolar em crianças. As questões éticas envolvendo a realização do lavado broncoalveolar em crianças dificultam a obtenção de valores de referência, na faixa etária pediátrica, em grandes casuísticas. Apesar das variações entre os diferentes estudos, a celularidade total e o diferencial celular obtidos em crianças são similares ao que se observa em adultos. Alguns dos resultados obtidos por estudos realizados em crianças sem doença no parênquima pulmonar que foram submetidas à broncoscopia por indicações como estridor, corpo estranho ou durante cirurgia eletiva estão especificados na tabela 2^(73;88).

5.2 PERFIL INFLAMATÓRIO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

A persistência do padrão neutrofílico foi observada na grande maioria dos pacientes portadores de asma de difícil controle que participaram deste estudo. Baseado na literatura, considerou-se aumento do número de neutrófilos no lavado broncoalveolar destes pacientes, valores superiores a 4% de neutrófilos. Embora Middula⁽⁶⁶⁾ tenha descrito valores percentuais de neutrófilos no lavado broncoalveolar de crianças em torno de 17%, em cinco outros estudos a mediana de neutrófilos obtida no lavado broncoalveolar de crianças saudáveis foi em torno de 3,5%^(73;87;88;93;94). Portanto, em nosso estudo, a mediana de neutrófilos obtida no lavado broncoalveolar de crianças portadoras de asma de difícil controle foi consideravelmente elevada quando comparada aos valores obtidos na literatura e em pacientes controles.

É praticamente impossível definir se, este aumento de neutrófilos observado, é uma entidade patológica distinta ou se trata de uma patologia associada à eosinófilos e o uso da corticoterapia foi responsável pela ausência destas células no lavado broncoalveolar destes pacientes. Outra possibilidade a se considerar é o aumento de neutrófilos secundário ao uso crônico de corticóide, uma vez que o mesmo é sabidamente responsável pela diminuição da apoptose e pelo aumento da sobrevivência dos neutrófilos⁽⁹⁵⁾. O papel dos neutrófilos permanece incerto nestes pacientes. Entretanto vêm sendo descritos na literatura, com grande frequência, a presença de neutrófilos em via aérea de pacientes que apresentaram episódios de asma fatal, asma noturna e asma grave⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾.

Não se evidenciou correlação entre a necessidade de corticóide oral e o aumento do número de neutrófilos no LBA. Djukanovic demonstrou que cursos de corticóide oral não tiveram influência no aumento do número de neutrófilos em vias aéreas de pacientes portadores da asma⁽⁹⁹⁾. Esses dados foram concordantes com os nossos achados. Amostras de sangue coletadas antes da broncoscopia evidenciaram que em 56% dos pacientes, o número total de leucócitos encontrava-se elevado, principalmente em decorrência do aumento dos neutrófilos (44%). Apenas 3 (11%) pacientes apresentaram eosinofilia periférica. Estes achados sugerem que o tratamento com corticóide oral levaria a diminuição do número de eosinófilos na circulação sistêmica porém provocariam um aumento dos neutrófilos periféricos em pacientes com asma de difícil controle. Entretanto, esta correlação se perde quando avaliamos a presença de neutrófilos em via aérea ($r_s=0.99$; $p=0.64$).

As implicações clínicas para este aumento de neutrófilos em via aérea de crianças portadoras de asma de difícil controle são, até o momento, desconhecidas.

É possível que o aumento de neutrófilos em via aérea seja decorrente da presença de infecção viral nestes pacientes. Nenhuma das crianças estudadas apresentou evidências clínicas de infecção do trato respiratório no período de quatro semanas anteriores a broncoscopia e a análise microbiológica das amostras foi negativa tanto para bactérias quanto para vírus respiratórios. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de infecção viral nestes pacientes, uma vez que rinovírus, metapneumovírus e coronavírus só poderiam ser detectados através de métodos moleculares que não foram utilizados neste estudo.

Outra importante consideração a se fazer é a respeito da possibilidade de infecção por *Chlamydia pneumoniae* neste grupo de pacientes. Recentemente tem sido levantada a hipótese de que a *Chlamydia pneumoniae* e o *Mycoplasma pneumoniae* estejam relacionados ao desencadeamento de sintomas em crianças asmáticas^(31;100). Estudos sugerem que a infecção por *Chlamydia pneumoniae* poderia induzir uma resposta imunológica com produção de citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral α , interleucina 1 β e IL-6), além da quimiotaxia para neutrófilos e inibição da apoptose celular⁽³¹⁾. A técnica mais indicada para a detecção da *Chlamydia pneumoniae*, por ser espécie-específica, é a microimunofluorescência, não realizada neste estudo.

É necessário considerar ainda, a possibilidade de outras infecções neste grupo. Nós definimos como cultura positiva aquelas amostras que apresentaram uma concentração de bactérias $\geq 10^5$ unidades formadoras de colônias por mililitro de lavado broncoalveolar. A força tarefa europeia para lavado broncoalveolar define este ponto de corte para amostras de lavado broncoalveolar não protegido⁽¹⁴⁾.

Outra causa potencial de neutrofilia é a presença de refluxo gastroesofágico (RGE). Existem controvérsias a respeito dos marcadores inflamatórios e a celularidade no lavado broncoalveolar de pacientes portadores de refluxo gastroesofágico. Ferreira, em estudo realizado em 36 crianças portadoras de refluxo gastroesofágico, demonstrou existir correlação entre o percentual de neutrófilos no lavado broncoalveolar e a pHmetria destes pacientes⁽¹⁰¹⁾. Em nosso estudo, 20 pacientes foram submetidos a pHmetria de 24 horas logo após o término da broncoscopia, sendo que sete crianças (7/20; 35%) apresentaram alterações no exame de phmetria (ph < 4 em um tempo superior a 4% do tempo de estudo). Cinco entre as sete crianças apresentaram um percentual elevado de neutrófilos no lavado broncoalveolar (mediana 23% variação 1,5-43%). Entretanto, não foi possível determinar, neste estudo, se o refluxo gastroesofágico teve papel relevante na celularidade da via aérea dos pacientes portadores de asma de difícil controle. Quatro das 20 crianças não realizaram a pHmetria logo após a broncoscopia, não sendo possível, nesses pacientes a correlação entre o resultado do exame e a celularidade do LBA.

Os pacientes realizaram prova de função pulmonar antes da realização da broncoscopia. Um dos objetivos do protocolo de asma de difícil controle foi a determinação da melhor função pulmonar desses pacientes. Admite-se que qualquer componente de reversibilidade da função pulmonar será obtido após curso prolongado de doses altas de corticoterapia oral, associado ao broncodilatador (VEF1 pós broncodilatador, pós corticóide). Kamada demonstrou que, em pacientes pediátricos, um aumento do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) após o uso de corticoterapia oral (40mg de prednisolona) por 2 semanas⁽¹⁰²⁾. Não se observou qualquer benefício para estes pacientes o uso de doses maiores de corticoterapia ou por tempo mais prolongado. Em estudo realizado por Lex⁽¹⁰³⁾, 18% (4/22) dos pacientes portadores de asma de difícil controle apresentaram, durante um período de seguimento de 12 meses, melhora dos valores de VEF1 (em pelo menos uma ocasião) quando comparados aos valores obtidos após 2 semanas de corticoterapia oral (prednisolona e/ou triancinolona). Entretanto, optamos por manter esta dose de corticoterapia (40 mg de prednisolona por 15 dias), em virtude dos possíveis efeitos colaterais de doses mais elevadas de corticóide, tendo-se em vista que apenas um pequeno percentual de pacientes se beneficiaria de doses mais elevadas ou por tempo superior a 2 semanas.

Consideramos como melhor função pulmonar obtida, o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) após o uso de 40mg de prednisolona por 2 semanas, pós broncodilatador.

Uma de nossas hipóteses foi a possibilidade de anormalidades na função pulmonar destes pacientes, associadas a padrões inflamatórios

específicos no lavado broncoalveolar. Admite-se que uma das alterações fisiológicas observadas nos pacientes com asma de difícil controle seja uma limitação progressiva do fluxo aéreo, possivelmente irreversível. Embora essa limitação do fluxo aéreo seja, provavelmente, apenas um dos componentes da doença, reconhece-se que a piora da função pulmonar está relacionada com uma maior gravidade da doença⁽⁷⁾.

Entretanto, pouco se conhece sobre a relação dos marcadores inflamatórios e da função pulmonar em crianças portadoras de asma de difícil controle (VEF1). Observamos uma tendência entre o aumento de neutrófilos no lavado broncoalveolar e uma pior função pulmonar (VEF1 pós broncodilatador; %: rs -0.38, p=0.08; per ml: rs -0.43, p=0.07) em nossos pacientes. Wenzel demonstrou uma associação entre anormalidades da função pulmonar e a presença de neutrófilos na biópsia brônquica de adultos portadores de asma de difícil controle⁽⁷⁾.

Embora não se saiba ao certo o papel dos neutrófilos, a inflamação neutrofílica vem sendo, cada vez mais, reconhecida como um importante componente em crianças portadoras de asma de difícil controle^(8;9;52;104). Terapêuticas antiinflamatórias alternativas capazes de reduzir o número de neutrófilos em vias aéreas, vêm sendo usadas empiricamente, uma vez que mais estudos são necessários antes que recomendações sejam feitas e drogas com potenciais efeitos colaterais sejam utilizadas nestas crianças.

Em nosso estudo, observamos que cinco dos vinte e quatro pacientes (20%) apresentaram persistência de eosinófilos no lavado broncoalveolar apesar do uso de corticóide oral nos 15 dias que precederam o exame.

A avaliação da adesão é muito importante nestes pacientes. A dosagem sérica de prednisolona e cortisol são métodos simples para avaliação da adesão. Neste estudo, evidência laboratorial ao uso de corticóide foi obtida em 21 pacientes. Em três pacientes, os níveis séricos de cortisol não foram obtidos. Dois dentre os três pacientes não apresentaram células inflamatórias no LBA. Uma das crianças sem evidência laboratorial de adesão ao tratamento apresentou persistência de eosinófilos em via aérea. Embora sem evidência laboratorial do uso do corticóide, esses pacientes foram considerados aderentes e incluídos no estudo. Todos os pacientes estavam em acompanhamento rigoroso no ambulatório de asma de difícil controle, com avaliações mensais da equipe médica. Avaliações domiciliares e visitas à escola, quando considerado necessário, eram realizadas pela enfermagem.

Estudos realizados com biópsia e LBA sugerem que cerca de 1/3 dos pacientes portadores de asma de difícil controle apresentam persistência do padrão eosinofílico apesar do uso de altas doses de corticóide oral⁽¹⁰⁵⁾. Além do elevado percentual de eosinófilos em via aérea, observou-se, no lavado broncoalveolar, um aumento de linfócitos T, mastócitos, TGF β e marcadores de ativação de linfócitos do tipo Th2 (como interleucina IL-2 e IL-4) de adultos asmáticos⁽¹⁰⁶⁾.

É possível que os pacientes que apresentam persistência de eosinófilos em via aérea, representem um subgrupo de pacientes caracterizado pela resistência parcial ao corticóide. Payne et al observaram anormalidades da afinidade corticóide/receptor e da translocação do

complexo corticóide /receptor do citoplasma para o núcleo celular em pacientes portadores de asma de difícil controle⁽⁴¹⁾. Outra possibilidade seria a resistência secundária ao processo inflamatório. Autores sugerem que o aumento de IL2 e IL4 seriam importantes moduladores da resistência parcial ao corticóide, observada em algumas dessas crianças. Sugere-se uma diminuição da afinidade do complexo corticóide/receptor e uma diminuição do efeito inibitório sobre fatores de transcrição secundário ao processo inflamatório. Experimentos em animais sugerem que infecções virais latentes são outro mecanismo a ser considerado⁽³⁸⁾.

Ten Brinke et al observaram a redução significativa do percentual de eosinófilos no escarro, além da melhora da função pulmonar, em adultos portadores de asma de difícil controle, após doses elevadas de corticoterapia sistêmica. Os autores sugerem que, um percentual de pacientes, responderia ao tratamento, sendo necessário, entretanto, doses muito elevadas de corticóide sistêmico⁽¹⁰⁵⁾.

É importante ressaltar que, crianças portadoras de asma de difícil controle, já se encontram em uso de doses elevadas de corticóide, muitas vezes associadas a outras medicações. Estudos recentes demonstraram que o uso prologado de doses elevadas de corticóide inalatório poderia levar a efeitos colaterais como a supressão adrenal, alterações ósseas e de crescimento. Paton et al recentemente demonstraram alterações em pacientes recebendo 500 µcg de fluticasona/dia⁽¹⁰⁷⁾ Estudo similar evidenciou que 20,8% das crianças recebendo 800 µcg de budesonida/dia apresentaram sinais de supressão adrenal⁽¹⁰⁸⁾. É necessário que mais

estudos sejam realizados e que os possíveis fenótipos sejam bem caracterizados antes do uso de doses ainda mais elevadas de medicamentos com risco potencial de efeitos colaterais importantes.

Em nosso estudo, duas crianças apresentaram efeitos colaterais graves secundários ao uso crônico de corticóide. Ambas apresentaram persistência de eosinófilos no LBA apesar do uso crônico do corticóide. É importante considerar, nesses casos, a necessidade do uso de terapias alternativas. Coren et al avaliaram o uso de ciclosporina em crianças portadoras de asma de difícil controle, observando uma redução na necessidade do uso do corticóide em alguns pacientes⁽¹²⁾. Entretanto, uma recente revisão enfatizou os efeitos colaterais da ciclosporina, apesar da resposta clínica observada em alguns pacientes.

Observamos que, as crianças com persistência do padrão eosinofílico no LBA, foram aquelas que mais necessitaram de cursos de corticoterapia oral nos 12 meses que precederam o estudo. Observou-se ainda uma correlação entre a necessidade de internação e o aumento do percentual de eosinófilos no LBA dessas crianças. Wenzel et al demonstraram que a persistência de eosinófilos está associada, adicionalmente às alterações estruturais da via aérea, com maior sintomatologia em adultos portadores de asma de difícil controle⁽⁷⁾.

Neste estudo, 6 dentre os 24 pacientes apresentaram ausência de eosinófilos no LBA. Quatro dos seis pacientes (66%) estavam em uso de corticóide oral diário (3 pacientes) ou em dias alternados (1 paciente). É possível que este fato seja decorrente do uso de corticóide,

embora seja difícil definir se este subgrupo representa uma entidade distinta, ou se a ausência de eosinófilos é apenas consequência do uso crônico de corticóide. Wenzel et al demonstraram em adultos portadores de asma grave, um subgrupo de pacientes em que não foi possível evidenciar eosinófilos na biópsia brônquica. Esse subgrupo de pacientes apresentou menor incidência de falência respiratória e necessidade de ventilação mecânica. Apenas 7% dos pacientes desse subgrupo necessitaram de ventilação mecânica, versus 60% dos pacientes que apresentaram persistência de eosinófilos na biópsia⁽⁷⁾.

É possível que os pacientes portadores de asma de difícil controle que evoluem com persistência de eosinófilos em via aérea, representem um subgrupo de pacientes caracterizado por maior instabilidade clínica.

É interessante citar que 20 % dos pacientes (5/24) não apresentaram células inflamatórias no LBA. Apenas uma das crianças estava em uso de corticóide crônico. Este subgrupo de pacientes, embora sem sinais de inflamação na via aérea e apresentando função pulmonar normal (mediana do VEF1 pós BD: 97%; variação 83-105%), permaneceu sintomático. Pouco se sabe sobre a fisiopatologia desses pacientes. Uma das possibilidades, nesse grupo, inclui a presença de inflamação em regiões distais da via aérea. Alguns autores sugerem que a inflamação das vias aéreas distais seja tão importante quanto à inflamação presente nas vias aéreas proximais⁽⁵⁹⁾.

Wenzel et al realizaram biópsia das regiões proximais e distais de 20 adultos asmáticos e concluíram que o processo inflamatório presente nas

vias aéreas proximais difere da inflamação presente em pequenas vias aéreas⁽¹⁰⁹⁾. Os autores observaram um predomínio de mastócitos em vias aéreas de pequeno calibre, e uma diminuição importante do percentual de neutrófilos quando comparado com as regiões proximais da via aérea⁽¹⁰⁹⁾.

Outra possibilidade seria que, apesar da ausência de células inflamatórias, esses pacientes apresentem alterações estruturais da via aérea que levariam à persistência de sintomas. Em recente estudo, Benayoun et al avaliaram 15 pacientes portadores de asma leve/moderada e 10 portadores de asma grave⁽¹¹⁰⁾. Os autores observaram que as principais diferenças observadas entre os grupos foram referentes à alterações estruturais da via aérea, como hipertrofia da musculatura lisa, e o acúmulo de fibroblastos, e não a presença de células inflamatórias na mucosa brônquica.

Parece ilógico tratar um grupo de crianças, sem sinais inflamatórios evidentes, com elevadas doses de antiinflamatórios. Payne et al observaram ausência de melhora clínica nesse subgrupo de crianças, após uso de corticosteroides⁽³⁵⁾. Maiores estudos são necessários para que se possa avaliar qual a melhor terapêutica nesse subgrupo de pacientes.

Outra possibilidade a se considerar, diante de um grupo de pacientes com ausência de sinais inflamatórios em via aérea, função pulmonar normal e persistência da sintomatologia é a possibilidade de um diagnóstico alternativo e ou fatores agravantes da asma. São poucos os estudos sobre a prevalência de demais patologias em crianças diagnosticadas como portadoras de asma de difícil controle. Estudo recente demonstrou que, em

um grupo de 33 crianças em acompanhamento como portadores de asma de difícil controle, 73% apresentaram alterações na pHmetria, 15% apresentavam infecção pulmonar e 25% apresentavam bronquiectasia⁽¹¹¹⁾.

Este estudo demonstrou que subgrupos de crianças portadoras de asma de difícil controle, apresentam características clínicas e funcionais distintas.

Os neutrófilos foram as células predominantes no lavado broncoalveolar. Pacientes com persistência do padrão neutrofílico no LBA apresentaram pior função pulmonar. Observou-se, em um percentual de crianças, a persistência de eosinófilos no LBA, mesmo após o uso de corticóide em altas doses anteriormente à broncoscopia. Estes pacientes apresentam níveis funcionais normais porém sinais de instabilidade clínica. Mais estudos são necessários para se determinar a eficácia de tratamentos antiinflamatórios alternativos nessas crianças. Um terceiro subgrupo de pacientes identificado neste estudo, consiste de crianças com ausência de sinais inflamatórios em via aérea, níveis funcionais normais e persistência da sintomatologia. Avaliação de diagnósticos diferenciais e ou fatores agravantes são de grande importância nesse subgrupo.

5.3 PROTOCOLO DE ASMA DE DIFÍCIL CONTROLE

Um dos objetivos do protocolo foi possibilitar uma melhor abordagem dos pacientes portadores de asma de difícil controle, baseando-se na hipótese de que os pacientes portadores de asma de difícil controle

apresentam diferentes perfis inflamatórios. Após o término do estudo, o tratamento foi modificado em 11/24 crianças (46%). Entre as modificações, citam-se a redução das doses de corticoterapia oral e o início de mediações alternativas.

Reconhecemos que um dos problemas do nosso estudo é o pequeno número de controles. Entretanto, uma vez que, eticamente, não é possível a realização da broncoscopia sem indicação clínica, esse grupo é necessariamente limitado. Entretanto, os dados obtidos em nossos controles são similares aos descritos na literatura.

Nós também reconhecemos que os pacientes recrutados nesse protocolo fazem parte de um grupo altamente selecionado de crianças portadoras de asma de difícil controle. Dessa forma, nossos resultados não podem ser aplicados de forma generalizada em todas as crianças asmáticas. Um ponto forte do nosso estudo foi ter utilizado o lavado broncoalveolar para a avaliação da via aérea, enquanto a maioria dos estudos em crianças utiliza o escarro induzido. O lavado broncoalveolar permite a avaliação de toda a via aérea, incluindo as vias aéreas distais e o espaço alveolar.

A biópsia brônquica e o lavado broncoalveolar são considerados o padrão ouro para a avaliação da inflamação da via aérea. Entretanto é importante enfatizar que estes procedimentos são, embora seguros e com mínimas complicações, considerados invasivos, não podendo, dessa forma, serem realizados repetidamente para a avaliação da via aérea.

Por serem métodos não invasivos e de fácil realização, seria preferível a utilização de exames como o óxido nítrico e o escarro induzido para a

avaliação das vias aéreas de crianças portadoras de asma grave. Entretanto, são poucos os estudos comparativos entre os métodos invasivos e não invasivos. Até o momento, os estudos vêm demonstrando diferenças quantitativas entre os marcadores inflamatórios, provavelmente por avaliarem diferentes compartimentos da via aérea⁽⁶²⁾. A utilização dos métodos não invasivos necessita de maiores estudos, antes de ser incorporada à prática clínica, como método isolado de avaliação da via aérea.

O uso de procedimentos invasivos, como o lavado broncoalveolar e a biópsia pulmonar, têm sido justificados nesses pacientes devido à gravidade da doença, com risco de episódios fatais ou quase fatais. Entretanto, é necessário que os pacientes sejam rigorosamente acompanhados antes do diagnóstico de asma de difícil controle ser estabelecido.

Crianças portadoras de asma de difícil controle constituem um grupo heterogêneo e o tratamento individualizado só pode ser determinado através da avaliação sistemática desse grupo de crianças. É de grande importância que os possíveis diagnósticos diferenciais, os fatores agravantes e a aderência ao tratamento sejam avaliados. Opções terapêuticas individuais devem ser avaliadas com base nos diferentes fenótipos e na resposta ao tratamento.

Um melhor entendimento dos diferentes padrões inflamatórios e das diferentes características clínicas e funcionais desses pacientes poderia definir precocemente a terapêutica mais apropriada às crianças portadoras de asma de difícil controle.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foram avaliadas vinte e quatro crianças portadoras de asma de difícil controle tratadas previamente com 40 mg de prednisolona. Observamos três perfis distintos no lavado broncoalveolar desses pacientes: neutrofílico, eosinofílico e ausência de células inflamatórias.

O predomínio de neutrófilos no LBA ocorreu em 14 pacientes (60%). Na análise das correlações, observou-se, nesse grupo, uma tendência entre o aumento de neutrófilos no LBA e uma pior função pulmonar (VEF_1).

Em cinco pacientes (20%) observou-se um aumento no número de eosinófilos. Os pacientes desse grupo tiveram um maior número de internações e maior necessidade de corticoterapia oral nos 12 meses que precederam o estudo, refletindo uma maior instabilidade clínica.

Em cinco pacientes (20%), apesar da sintomatologia persistente, não havia sinais inflamatórios no lavado broncoalveolar e alterações na função pulmonar.

Nós concluímos que as crianças portadoras de asma de difícil controle apresentam diferentes perfis inflamatórios no lavado broncoalveolar com características clínicas e funcionais distintas. Esses achados podem ter implicações terapêuticas diferenciadas em crianças portadoras de asma de difícil controle.

7. ANEXOS

Anexo A

Tabela 6 - Características clínicas dos 24 pacientes

Pacientes	Sexo	Idade anos	IgE IU/ml	RAST teste	Necessidade de β_2 nos 15 dias anteriores ao LBA	Cursos de prednisolona nos últimos 12 meses	Número de internações nos últimos 12 meses	VEF ₁ pós β_2 % predito	Uso crônico de corticóide
1	M	12	-	C/D/G	≥7 vezes/semana	4	4	79	-
2	M	4	27	neg	≥7 vezes/semana	12	10	-	UDA
3	F	9	207	neg	≥7 vezes/semana	2	0	116	-
4	F	13	5014	C/D/G/H	3-6vezes/semana	3	3	83	-
5	F	13	-	C	-	3	3	58	-
6	F	14	1425	C/G/H	≥7 vezes/semana	4	4	56	UD
7	M	12	251	C/G/H	<3 vezes/semana	1	0	74	UD
8	M	14	733	G/H	3-6vezes/semana	1	1	65	UD
9	M	14	-	C/H	<3 vezes/semana	4	0	97	-
10	M	6	-	G	-	3	1	105	-
11	F	6	19	G	≥7 vezes/semana	3	3	80	-
12	F	13	329	C/G/H	≥7 vezes/semana	4	4	49	-
13	M	14	470	C/D/G	-	4	4	54	UDA
14	F	6	562	neg	3-6vezes/semana	2	1	101	-
15	F	5	229	C/D/G	≥7 vezes/semana	12	10	74	-
16	F	4	309	neg	≥7 vezes/semana	6	5	-	-
17	M	13	658	C/H	≥7 vezes/semana	10	10	72	UDA
18	M	12	511	C/D	-	6	4	64	-
19	M	13	-	G/H/M	≥7 vezes/semana	4	4	79	UDA
20	M	9	718	G/H	-	12	6	102	-
21	F	13	26	neg	≥7 vezes/semana	5	5	94	UDA
22	F	14	1669	C/D/G/H	-	9	9	65	UDA
23	M	9	31	neg	≥7 vezes/semana	1	1	92	-
24	M	13	2772	G/H	≥7 vezes/semana	3	3	61	UDA
Mediana		13	470			5	4	76	
Variação		5-14	19-5014			1-12	0-10	49-116	

D= epitélio de cão/ C=epitélio de gato/G= gramíneas/H=ácaro/M=fungo/ UD=uso diário/UDA=uso em dias alternados

Tabela 7 - Lavado broncoalveolar dos 24 pacientes

Pacientes	Macrófago %	Linfócitos %	Neutrófilos %	Eosinófilos %	Mastócitos %	Cel. Epiteliais %
1	72	13	3	9	0	3
2	66,5	12	15	1,5	0	5
3	78	6	11,5	0,5	0	4
4	88	7	3	0,5	0	1,5
5	74,5	6,5	0,5	18,5	0	0
6	55,5	7,5	35	2	0	0
7	82,5	7,5	10	0	0	0
8	85	9	6	0	0	0
9	80	7,5	12	0,5	0	0
10	88	7,5	3	1,5	0	0
11	60	24	15	0	0,5	0,5
12	42	13	43	1,0	0	0
13	83,5	7,5	4,5	2,0	0	3
14	74	11	2,5	2,5	0	10
15	52	3	41	1,0	0	3
16	60	10	21	3,0	0	6
17	52	36	4	6,5	0	1,5
18	42	9	26	14	0	9
19	69	10	16	0	0	5
20	74	7,5	1,5	9	0	8
21	84	7	1,5	2,5	0	5
22	68	15	4,5	2,5	0	10
23	85	10	2	0	0	3
24	84,5	6	6,5	0	0	10
Mediana	74.0 (42.0-88.0)	8.2 (3.0-36.0)	6.2 (0.5-43.0)	1.5 (0-18.5)	0 (0-0.5)	3.0 (0-10.0)

Anexo B

PROTOCOL FOR ASSESSMENT OF CHILDREN WITH DIFFICULT ASTHMA

Introduction

The majority of children with asthma have symptoms that are well controlled with inhaled steroids, with or without the addition of a long-acting β_2 -agonist. A small proportion of children, however, continues to experience frequent symptoms despite such treatment. These are children with difficult asthma. The lives of these children are severely disrupted with frequent visits to hospital, absence from school and a marked restriction in normal daily activities. Although they account for a small percentage (probably <5%) of the total number of children with asthma, their contribution to asthma morbidity and use of health service resources is disproportionately high.

Patients with difficult asthma may be broadly divided into three groups:

- pseudo-steroid resistant asthma: patients who do not actually have asthma
- steroid-dependent asthma: patients who respond to steroids, but only at high doses, with the risk of steroid side-effects
- steroid-resistant asthma: patients who do not respond to steroids, even at high doses

Identification of patients with pseudo-steroid resistant asthma requires an awareness of the alternative diagnoses that may mimic asthma. Once the real diagnosis is made, appropriate treatment can be given. For children with steroid-dependent and steroid-resistant asthma, the underlying mechanisms are not well understood, and there is little scientific evidence to guide the choice of further treatment. Our aim is to investigate the mechanisms underlying genuinely difficult asthma in children, using exhaled nitric oxide, sputum induction and fiberoptic bronchoscopy to describe cellular and molecular phenotypes.

Subjects

Children with difficult asthma will be studied. The following definition of difficult asthma, based on that given by the ERS Task Force, will be used:

- symptoms requiring rescue bronchodilator on ≥ 3 days/week, despite treatment with ≥ 1600 mcg/day of inhaled budesonide (or equivalent), as well as regular long-acting β_2 -agonist (or a previous unsuccessful trial of long-acting β_2 -agonist).

The dose of inhaled steroids included in this definition (1600mcg/day) is higher than that used in the ERS definition (800mcg/day). This reflects the patient population seen at the Royal Brompton Hospital.

Patients, aged 5-17 years, will be referred from the paediatric asthma clinic of the Royal Brompton Hospital. Prior to inclusion, efforts will be made in the clinic to ensure satisfactory inhaler technique, maximise treatment adherence and reduce exposure to precipitating factors. Patients will be investigated for the presence of other diagnoses mimicking or co-existing with asthma, and appropriate treatment given if indicated. Input from a clinical psychologist will be sought if significant psychosocial factors are thought to play a role. If, despite these measures, patients continue to fit the criteria for difficult asthma, they will be enrolled in the following protocol.

Protocol for assessment of children with difficult asthma

Patients will be seen on two occasions. They must be free from a clinical upper or lower respiratory tract infection for two weeks prior to the first visit, and also for the two weeks between the first and second visits. For two weeks prior to the first visit, maintenance corticosteroid dose (inhaled and oral) must remain unaltered. Before the first visit, patients will complete a two-week diary, recording bronchodilator use, symptom-free days and morning and evening pre-bronchodilator peak expiratory flow (PEF), using a Wright mini peak flow meter. Spirometry will be performed, and NO measured. Spirometry will be repeated 20 minutes after the administration of salbutamol, either 5mg via a nebuliser or 1000mcg via a metered dose inhaler and spacer, depending on patient preference. If post-bronchodilator FEV_1 is $> 65\%$ predicted, sputum induction will be performed. Blood will be taken for total serum IgE and RAST tests to cat, dog, house dust mite (HDM) and grasses. Patients will then be treated with two weeks of oral prednisolone (40mg/day). The diary will be continued and after completion of the prednisolone course, patients reviewed. Spirometry, NO and sputum induction will be repeated. Blood will be taken for measurement of serum prednisolone and cortisol, and the time of the last prednisolone dose recorded. The following day patients will undergo fiberoptic bronchoscopy under general anaesthetic. Salbutamol 5mg will be administered via a nebuliser 30 minutes prior to induction of anaesthesia. Following inspection of the bronchial tree, bronchoalveolar lavage will be performed in the right middle lobe. Six endobronchial biopsies will be taken from the subcarinae of the right lower lobe.

Management decisions following completion of the investigations

The aim of the protocol is to investigate the mechanisms underlying difficult asthma. Further management decisions will be made on the basis of these findings. Possible scenarios are outlined below.

1. The child does not have asthma.

Another cause for the symptoms may be found, such as a vascular ring or tracheomalacia. The aim is to treat the underlying condition if possible, and reduce the asthma treatment and eventually stop it.

2. The child has mild asthma that is being overtreated.

This type of patient will have excellent lung function, little evidence of reversibility to bronchodilator, and evidence of minimal or no airway inflammation (as assessed by NO, sputum and bronchoscopy). There may be continuing symptoms. The aim is to reduce the level of asthma treatment and assess the reasons for persistent symptoms.

3. The child has severe asthma which responds well to oral prednisolone.

This type of patient has frequent symptoms which respond well to the 2 week course of prednisolone. This may be associated with an improvement in lung function, a fall in NO, and evidence of minimal inflammation on bronchoscopy. Management should involve using the lowest dose of steroids (oral or inhaled) that controls symptoms (?and inflammation). Attention should be paid to adherence to inhaled steroids (we have electronic monitors for MDIs which can be used for this purpose).

4. The child has severe asthma which does not respond well to oral prednisolone.

In this situation the diagnosis of asthma must be reviewed carefully, and adherence to the prednisolone course established (using prednisolone/cortisol levels and frank discussion with the family). If the child does have asthma and adherence to prednisolone is fairly certain, then some other form of treatment should be tried. The presence or absence of persistent airway inflammation (NO, sputum, BAL, biopsy) following prednisolone treatment will guide the choice of treatment

- a) Persistent inflammation: treatment options include cyclosporin, intravenous immunoglobulin or methotrexate. Cyclosporin is our treatment of choice, although it has many side-effects, particularly on the kidneys.
- b) Minimal inflammation: a continuous subcutaneous infusion of terbutaline (CSIT) is first line treatment.

These are guidelines at the moment, with little evidence to back them up. We plan to prospectively evaluate the effectiveness of this approach.

Anexo C

Royal Brompton & Harefield NHS Trust & National Heart and Lung Institute

INFORMATION and CONSENT FORM

PAEDIATRIC PATIENT

TITLE OF PROJECT:

Cross sectional prospective study of broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and inflammatory mediators in exhaled breath in children

We invite you to consider allowing your child/ward to take part in a research project.

EXPLANATION OF PROJECT:

Some diseases of the lungs involve some degree of inflammation, which at present can best be assessed by bronchoscopy, which involves passing a tube through the nose into the airways of the lungs, under a local anaesthetic. Your child is going to have a bronchoscopy as part of her/his treatment. The process involves washing the lungs with saline (slightly salty water), which is normally thrown away after testing.

We are trying to find ways in which the lung inflammation can be assessed without the need to put tubes into the lungs, and one possible way of doing this is to measure certain chemical substances which are found in the air breathed out. At present, we are not certain how reliable these measurements are, and so we are asking whether you would help us by allowing your child to do two simple extra tests which are not at all unpleasant, but would allow us to compare the results with those from the bronchoscopy. It may be that we could avoid the need for bronchoscopy in the future, if these tests prove to be reliable, though of course they will not benefit your child directly.

First, before the bronchoscopy we would like your child to blow into a machine which can measure the amount of a gas called nitric oxide in the breath. This is present in everyone's breath, but more of it is found in the breath of people who have inflammation in their airways.

Secondly, we would like your child to breathe normally for ten minutes into a tube attached to a machine which collects the moisture in the breath, and condenses it to a liquid. The chemicals found in this may also indicate the amount of inflammation in the lungs.

Thirdly, we would like your permission to do some extra tests on the saline washing from the bronchoscopy after the clinical tests are finished, to count cells and to measure the chemicals found in that.

We hope that by comparing the three different measurements we may be able to avoid the need for bronchoscopy in the future.

None of these three tests involves any known risk and none is painful or unpleasant. No genetic research is involved, and we will destroy any specimens once our tests are complete. The data from the tests will be stored in a computer, and confidentiality will be maintained in accordance with Data Protection laws. No personal details will be used in reporting the results of our research.

Please understand that your child need not take part in the research if either she/he or you do not wish to do so. If you do agree, you or your child may change your mind at any time, and need not give any reason. If you decide not to take part, or if you withdraw, your child's care and treatment will not be affected in any way. If you do take part, we shall be most grateful, and other children in the future may benefit from our research.

Thank you very much for your kindness in considering the project.

Signed by the person in charge of the Project

Date 3 July 01

The Ethics Committee of the Royal Brompton & Harefield NHS Trust/National Heart & Lung Institute has approved the above statement.

Signed by the Chairman/Representative of the Committee

Derek Glick

Date 3/7/01

DOCTOR'S DECLARATION

I have explained the project to the Participant as outlined above in the presence/absence* of a Witness**

Signed

Date

Time

delete as appropriate
witness

** every effort should be made to give the explanation in the presence of a

Protocol Reference Number: 01-131

Page 1

Anexo D

ROYAL BROMPTON & HAREFIELD NHS TRUST and NATIONAL HEART & LUNG INSTITUTE

Your Child's Bronchoscopy Examination

Your child's consultant paediatrician has explained to you why your child should have an examination of her/his lung(s), which is called a bronchoscopy. We think you would also like to have some written information about it, to help you consider what is involved, and so that you and your child can ask any questions you may have about the bronchoscopy, or indeed any other aspect of your child's care.

This leaflet is only to provide basic information. It is not a substitute for discussion with the doctors caring for your child.

What will happen?

Bronchoscopy can sometimes be rather unpleasant, so when children have a bronchoscopy, a general anaesthetic is used, so that they are asleep whilst anything is being done. A consultant anaesthetist will give the anaesthetic, assisted by another doctor (a "specialist registrar"). Your child may be able to choose whether to go to sleep by breathing anaesthetic gas from a mask over the face, or by having an injection. But the final decision must be made by the consultant anaesthetist, who is responsible for the safety of your child whilst (s)he is asleep. You will have the opportunity to see a doctor from the anaesthetic team beforehand, when you can discuss what will happen.

After the anaesthetic has been started and your child is asleep, a needle will be put into a vein so that other necessary drugs can be administered. (This is called an "intravenous drip".)

The bronchoscopy will then be done by a consultant paediatrician, usually with the assistance of another doctor, (again a "specialist registrar") who may do part of the procedure, under the close supervision of the consultant.

The bronchoscope is a very flexible tube, which is passed through the nose into the "airway" (the windpipe and tubes connected to the lung). Pictures from this are displayed on a video screen, and a recording is also made, which can be referred to later if necessary. You and your child will be most welcome to see the video afterwards, if you would like. The bronchoscope can also be used to "wash" the airway, using sterilised salty water, which is immediately sucked out again, and to take tiny samples, about the size of a pinhead, of the inside of the airway. This is quite painless, though if your child coughs, there may be flecks of blood in the spit for a short time. These samples can tell us more about your child's problems.

We will if possible do anything else necessary which might be unpleasant or painful (such as taking blood samples) whilst your child is asleep. These will be explained to you separately, and your and your child's consent sought in the normal way.

Are there any risks?

There are always small risks in having an anaesthetic, and the anaesthetist will explain these to you. There are also small risks in having a bronchoscopy. However, we perform more than 200 of these on children every year at this hospital, and the vast majority of these are without complications, and the child is able to go home the same day. The commonest reaction is a slightly high temperature, and normally paracetamol (Calpol) deals with this. The risks of having an unplanned stay overnight are less than 1% overall in this hospital.

Small babies, especially those who have difficulty in breathing-in ("stridor") before the bronchoscopy, may need extra monitoring, or help with their breathing for a while afterwards. If necessary, they will be cared for in the paediatric intensive care unit, or high dependency unit.

If you are concerned about your child after you have gone home, you can always speak to a doctor. Please ring the hospital (020 7352 8121) and ask the operator to bleep the on-call paediatric respiratory registrar.

Teaching and Research

As well as patient care, the Royal Brompton Hospital also undertakes teaching and research. This is how medical care and treatment is gradually improved, and it depends upon the generosity of patients who assist us. We would therefore like you to consider allowing us to include your child's bronchoscopy in either or both of these activities. It is important that you understand this is entirely optional. You do not have to agree, and if you prefer not to, you need give no reason for your decision. Whatever you decide will not in any way affect the way your child is treated, nor the timing of the bronchoscopy or any other treatment.

Please would you read the following numbered paragraphs, and cross out any you do not feel happy to consent to, and then sign this sheet. We will then put a copy of this in your child's notes, and give you one to keep.

1. The videotapes of the bronchoscopy are kept for future reference, as is routine with all clinical images. We would like to have you and your child's permission to use clips and stills from these tapes for the purpose of teaching doctors in training. This will be anonymous; no details which would enable your child to be identified would be given.
2. We often have doctors and nurses visiting us from other units. We would like your permission to let them watch the procedure after your child is asleep. They would be observers only, and would not take any active part in the procedure without prior permission from you and your child.
3. As we have explained, bronchoscopy involves washing a part of the airway with salt water (normal saline) and collecting the washings to look for things like inflammation and infection. We would like your permission to freeze and retain any washings left over, rather than throwing them away, so that they can be used for future research studies. These studies would only be carried out after approval from the Hospital Ethics Committee. No details which would enable your child to be identified would be given to any person working on these samples who is not directly concerned with the clinical care of your child. If later on you wished the sample to be destroyed, we would of course do this. *These samples may contain small amounts of genetic material (DNA), and thus could be used for genetic testing, for example looking for the genetic causes of asthma. However, any such research could only happen with the prior approval of the Ethics Committee of the Brompton Hospital, who would ensure your child's rights are protected. It would have NO implications for future insurance policies for your child.*

There is an advantage to your child in storing excess samples, in that if new information becomes available, they could be used for tests beneficial to your child. This is normal clinical routine, and we could not do this if the samples are destroyed. There are therefore three choices for you to make. Firstly, we destroy the samples immediately after testing. Secondly, we keep the samples for possible future clinical tests, but promise they are not to be used for research. Thirdly, we store the samples and use them either for clinical tests or research, with the safeguards listed above. Please cross out all but one of the following options:

- A) The salt solution is destroyed after initial analysis
- B) The salt solution is stored, and may be used if a new clinical test of benefit to your child is developed, but not used for research
- C) The tissue is stored, and can be used for new clinical tests and for research

4. As we have explained, bronchoscopy involves taking small samples of the airway with forceps. These samples are about the size of a pin head. They are also to look for things like inflammation and infection. We would like your permission to freeze and retain any tissue left over, rather than destroy it, so that it could be used for future research studies. These studies would only be carried out after approval from the Hospital Ethics Committee. No details which would enable your child to be identified would be given to any person working on these samples who is not directly concerned with the clinical care of your child. If later on you wished the sample to be destroyed, we would of course do this. *These samples DO contain genetic material (DNA), and thus could theoretically be used for genetic testing, for example looking for the genetic causes of asthma. However, any such research could only happen with the prior approval of the Ethics Committee of the Brompton Hospital, who would ensure your child's rights are protected. It would have NO implications for future insurance policies for your child.*

There is an advantage to your child in storing excess samples, in that if new information becomes available, they could be used for tests beneficial to your child. This is normal clinical routine, and we could not do this if the samples are destroyed. There are therefore three choices for you to make. Firstly, we destroy the samples immediately after testing. Secondly, we keep the samples for possible future clinical tests, but promise they are not to be used for research. Thirdly, we store the samples and use them either for clinical tests or research, with the safeguards listed above. Please cross out all but one of the following options:

- A) The tissue is destroyed after initial analysis
- B) The tissue is stored, and may be used if a new clinical test of benefit to your child is developed, but not used for research
- C) The tissue is stored, and can be used for new clinical tests and for research

Thank you for reading this information sheet. Please cross out any or all of the numbered paragraphs if either you or your child are NOT completely happy to agree to them. If you do agree, and then later on you or your child change your mind, and want the samples destroyed, let us know and this will be arranged. Remember you do not have to give any reason at all. The choice is yours.

Please sign and date this document. We will give you a copy to keep for reference, and a copy will be placed in your child's notes. This means we can always let you have a photocopy if needs be.

Thank you very much indeed.

Signed: _____ (Parent/Carer) Date: _____

Signed: _____ (Consultant) Date: _____

Anexo E

Brompton Harefield & NHLI Ethics Committee

ROYAL BROMPTON HOSPITAL • SYDNEY STREET • LONDON SW3 6NP

Telephone & Facsimile 020 7351 8437

4 July, 2001

Our Ref: 01-131

Dr S K Shahid
Asthma Laboratory
RBH

Dear Dr Shahid

I am writing to say that your protocol entitled

**Cross-sectional prospective study of broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and
inflammatory mediators in exhaled breath in children**

has been approved by the Chairman acting under delegated authority of the Committee as a low risk, non-invasive study. This approval is for twelve months from the date of this letter and may if necessary be extended upon request.

NB Before commencing the study, it must be registered with the Research Office. I will notify them that ethical approval has been given.

As you know, it is important that written consent is obtained from all those participating in a clinical research investigation. I enclose the standard consent form approved by the Ethics Committee for use in this project. The Committee would wish the study and consent form to be explained to participants in the presence of an independent witness, although it is aware that this is not always possible.

Please note that a copy of each consent form must sent to the Ethics Committee Office immediately upon signature by the subject. This is required for audit purposes, and is a condition of approval. It is no longer sufficient to send these at the completion of the project.

The Committee should be informed immediately of any adverse reactions or unexpected events which arise during the course of this project, or if it has to be terminated before completion. I should be grateful if you would bear this in mind.

Yours sincerely

Christian Pearson
Administrator

Anexo F

Royal Brompton & Harefield

NHS Trust

Royal Brompton Hospital
Sydney Street
London
SW3 6NP

Tel: 020 7352 8121
Fax: 020 7351 8473

I confirm that I am very happy for you to use the data which you yourself have garnered. It must be used in such a way that reporting is anonymous, i.e. no individual patient can be identified from the report. This I imagine will not be a problem. Indeed, the Ethics Committee here would take the view that it would be unethical not to report and publish.

Yours sincerely

Dr Andrew Bush MD FRCP FRCPCH
Reader & Honorary Consultant in Paediatric Respiriology

Anexo G

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 31.05.04 tomou conhecimento da execução do Protocolo de Pesquisa nº **391/04**, intitulado: "**Perfil celular do lavado broncoalveolar em crianças com asma de difícil controle**", apresentado pelo Departamento de PEDIATRIA.

No que tange a sua parte empírica, foi desenvolvido no Royal Brompton Hospital, Londres tendo o responsável pelo serviço autorizado o uso dos dados.

Pesquisador Responsável: **Dr. Joaquim Carlos Rodrigues**

Pesquisador Executante: **Dra. Flávia de Aguiar Ferreira**

CAPPesq, 31 de Maio de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

8. REFERÊNCIAS

- (1) O'Byrne PM, Bousquet J. Global Initiative For Asthma, Global Strategy For Asthma Management And Prevention, National Institutes Of Health, National Heart, Lung and Blood Institute. 2006.
- (2) Szeffler SJ. Altering the course of asthma: Introduction. J Allergy Clin Immunol. 2002;109(6 Suppl):S519-S520.
- (3) Godard P, Chanez P, Siraudin L, Nicoloyannis N, Duru G. Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study. Eur Respir J. 2002;19(1):61-7.
- (4) National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report II. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NHBLI, NIH. 1997.
- (5) The British Guidelines on Asthma Management, Review and Position and Statement. *Thorax* ; 1995.
- (6) Payne D, Bush A. Phenotype-specific treatment of difficult asthma in children. Paediatr Respir Rev. 2004;5(2):116-23.
- (7) Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, 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(3):1001-8.
- (8) Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
- (9) Kamath AV, Pavord ID, Ruparelia PR, Chilvers ER. Is the neutrophil the key effector cell in severe asthma? *Thorax*. 2005;60(7):529-30.
- (10) Berry M, Hargadon B, Morgan A, Shelley M, Richter J, Shaw D, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. Eur Respir J. 2005;25(6):986-91.
- (11) Chan MT, Leung DY, Szeffler SJ, Spahn JD. Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. J Allergy Clin Immunol. 1998;101(5):594-601.

-
- (12) Coren ME, Rosenthal M, Bush A. The use of cyclosporin in corticosteroid dependent asthma. *Arch Dis Child*. 1997;77(6):522-3.
  - (13) Payne DN, Balfour-Lynn IM, Biggart EA, Bush A, Rosenthal M. Subcutaneous terbutaline in children with chronic severe asthma. *Pediatr Pulmonol*. 2002;33(5):356-61.
  - (14) Chung KF, Godard P, Adelroth E, Ayres J, Barnes N, Barnes P, et al. Difficult/therapy-resistant asthma: the need for an integrated approach to define clinical phenotypes, evaluate risk factors, understand pathophysiology and find novel therapies. ERS Task Force on Difficult/Therapy-Resistant Asthma. European Respiratory Society. *Eur Respir J*. 1999;13(5):1198-208.
  - (15) Bush A. Diagnosis of asthma in children under five. *Prim Care Respir J*. 2007;16(1):7-15.
  - (16) Braman SS. The global burden of asthma. *Chest*. 2006;130(1 Suppl):4S-12S.
  - (17) Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004;59(5):469-78.
  - (18) Shapiro GG, Stout JW. Childhood asthma in the United States: urban issues. *Pediatr Pulmonol*. 2002;33(1):47-55.
  - (19) Mallol J, Sole D, Asher I, Clayton T, Stein R, Soto-Quiroz M. Prevalence of asthma symptoms in Latin America: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Pulmonol*. 2000;30(6):439-44.
  - (20) Irwin RS, Curley FJ, French CL. Difficult-to-control asthma. Contributing factors and outcome of a systematic management protocol. *Chest*. 1993;103(6):1662-9.
  - (21) Field SK, Sutherland LR. Gastro-esophageal reflux and asthma. *Thorax*. 2001;56(11):898.
  - (22) Harding SM. Gastroesophageal reflux: a potential asthma trigger. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2005;25(1):131-48.
  - (23) Field SK, Underwood M, Brant R, Cowie RL. Prevalence of gastroesophageal reflux symptoms in asthma. *Chest*. 1996;109(2):316-22.
  - (24) Harding SM. Recent clinical investigations examining the association of asthma and gastroesophageal reflux. *Am J Med*. 2003;115 Suppl 3A:39S-44S.

-
- (25) Liou A, Grubb JR, Schechtman KB, Hamilos DL. Causative and contributive factors to asthma severity and patterns of medication use in patients seeking specialized asthma care. *Chest*. 2003; 124(5):1781-8.
- (26) Gibson PG, Henry RL, Coughlan JL. Gastro-oesophageal reflux treatment for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001496.
- (27) Field SK, Field TS, Cowie RL. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2001;47(3):137-50.
- (28) Nimmagadda SR, Szeffler SJ, Spahn JD, Surs W, Leung DY. Allergen exposure decreases glucocorticoid receptor binding affinity and steroid responsiveness in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(1):87-93.
- (29) Saglani S, McKenzie SA. Environmental factors relevant to difficult asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2002;3(3):248-54.
- (30) Ibiapina CC, Sarinho ES, da Cruz Filho AA, Camargos PA. Rhinitis, sinusitis and asthma: hard to dissociate? *J Bras Pneumol*. 2006;32(4):357-66.
- (31) Wyrick PB, Knight ST, Paul TR, Rank RG, Barbier CS. Persistent chlamydial envelope antigens in antibiotic-exposed infected cells trigger neutrophil chemotaxis. *J Infect Dis*. 1999;179(4):954-66.
- (32) Von HL, Toyryla M, Gimishanov A, Bloigu A, Leinonen M, Saikku P, et al. Asthma, atopy and *Chlamydia pneumoniae* antibodies in adults. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(4):522-8.
- (33) Black PN, Scicchitano R, Jenkins CR, Blasi F, Allegra L, Wlodarczyk J, et al. Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. *Eur Respir J*. 2000;15(2):254-9.
- (34) Gibson NA, Ferguson AE, Aitchison TC, Paton JY. Compliance with inhaled asthma medication in preschool children. *Thorax*. 1995;50(12):1274-9.
- (35) Payne DN, Wilson NM, James A, Hablas H, Agrafioti C, Bush A. Evidence for different subgroups of difficult asthma in children. *Thorax*. 2001;56(5):345-50.
- (36) Payne DN, Bush A. "Refractory" eosinophilic airway inflammation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(12):1385-6.
- (37) Wenzel S. Severe/fatal asthma. *Chest*. 2003;123(3 Suppl):405S-10S.

-
- (38) Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):3-22.
  - (39) Adcock IM, Lane SJ. Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. *J Endocrinol*. 2003;178(3):347-55.
  - (40) Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(3 Pt 2):S1-53.
  - (41) Payne DN, Adcock IM. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatr Respir Rev*. 2001;2(2):145-50.
  - (42) Woolcock AJ, Salome CM, Yan K. The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1984;130(1):71-5.
  - (43) Bel EH, van d, V, Kramps JA, Dijkman JH, Sterk PJ. Maximal airway narrowing to inhaled leukotriene D4 in normal subjects. Comparison and interaction with methacholine. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136(4):979-84.
  - (44) Pliss LB, Ingenito EP, Ingram RH, Jr. Responsiveness, inflammation, and effects of deep breaths on obstruction in mild asthma. *J Appl Physiol*. 1989;66(5):2298-304.
  - (45) Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, et al. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(8):857-62.
  - (46) Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(12):1622-8.
  - (47) de BJ, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Jaubert F, Scheinmann P, Gosset P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1):94-100.
  - (48) Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2000;30 Suppl 1:22-7.
  - (49) Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med*. 2001;344(5):350-62.
  - (50) Costa JJ, Weller PF, Galli SJ. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *JAMA*. 1997;278(22):1815-22.
  - (51) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1720-45.

-
- (52) Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*. 2002;57(7):643-8.
  - (53) Redington AE, Polosa R, Walls AF, Howarth PH, Holgate ST. Role of mast cells and basophils in asthma. *Chem Immunol*. 1995;62:22-59.
  - (54) Spahn JD, Szefer SJ. Childhood asthma: new insights into management. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(1):3-13.
  - (55) Ward C, Pais M, Bish R, Reid D, Feltis B, Johns D, et al. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax*. 2002;57(4):309-16.
  - (56) Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2007.
  - (57) Rasmussen F, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Greene JM, Herbison GP, et al. Risk factors for airway remodeling in asthma manifested by a low postbronchodilator FEV1/vital capacity ratio: a longitudinal population study from childhood to adulthood. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(11):1480-8.
  - (58) Wenzel S. Pathology of difficult asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2003;4(4):306-11.
  - (59) Wenzel S. Severe asthma: epidemiology, pathophysiology and treatment. *Mt Sinai J Med*. 2003;70(3):185-90.
  - (60) Wilson NM, James A, Uasuf C, Payne DN, Hablas H, Agrofoti C, et al. Asthma severity and inflammation markers in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2001;12(3):125-32.
  - (61) Wenzel SE. Phenotypes in asthma: useful guides for therapy, distinct biological processes, or both? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(6):579-80.
  - (62) Lex C, Ferreira F, Zacharasiewicz A, Nicholson AG, Haslam PL, Wilson NM, et al. Airway eosinophilia in children with severe asthma: predictive values of noninvasive tests. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(12):1286-91.
  - (63) Lex C, Jenkins G, Wilson NM, Zacharasiewicz A, Erin E, Hansel TT, et al. Does sputum eosinophilia predict the response to systemic corticosteroids in children with difficult asthma? *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(3):298-303.
  - (64) Pizzichini E, Pizzichini MM, Hargreave FE. Variability of markers of airway inflammation in BAL. *Eur Respir J*. 1996;9(12):2700-1.

-
- (65) Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(2 Pt 1):308-17.
- (66) Midulla F, de BJ, Barbato A, Bush A, Eber E, Kotecha S, et al. Flexible endoscopy of paediatric airways. *Eur Respir J*. 2003;22(4):698-708.
- (67) Payne D, McKenzie SA, Stacey S, Misra D, Haxby E, Bush A. Safety and ethics of bronchoscopy and endobronchial biopsy in difficult asthma. *Arch Dis Child*. 2001;84(5):423-6.
- (68) Ratjen F, Nicolai T. Paediatric bronchoscopy. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5 Suppl A:S21-S22.
- (69) de BJ, Midulla F, Barbato A, Clement A, Dab I, Eber E, et al. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. *Eur Respir J*. 2000;15(1):217-31.
- (70) Le BM, Goncalves M, Le CL, Benoist MR, Fournet JC, Scheinmann P, et al. Bronchoalveolar cells in children < 3 years old with severe recurrent wheezing. *Chest*. 2002;122(3):791-7.
- (71) Ratjen F, Bruch J. Adjustment of bronchoalveolar lavage volume to body weight in children. *Pediatr Pulmonol*. 1996;21(3):184-8.
- (72) Ratjen F, Costabel U. [Bronchoalveolar lavage in childhood: technical aspects and reference values]. *Pneumologie*. 1997;51(2):93-8.
- (73) Ratjen F. Normal values of bronchoalveolar lavage. *Pediatr Pulmonol Suppl*. 1997;16:101-2.
- (74) Ratjen F. Reference values for bronchoalveolar lavage in children. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2000;55(3):247-50.
- (75) Ennis M, Turner G, Schock BC, Stevenson EC, Brown V, Fitch PS, et al. Inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage samples from children with and without asthma. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(3):362-6.
- (76) Shields MD, Brown V, Stevenson EC, Fitch PS, Schock BC, Turner G, et al. Serum eosinophilic cationic protein and blood eosinophil counts for the prediction of the presence of airways inflammation in children with wheezing. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(10):1382-9.
- (77) Stevenson EC, Turner G, Heaney LG, Schock BC, Taylor R, Gallagher T, et al. Bronchoalveolar lavage findings suggest two different forms of childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(9):1027-35.

-
- (78) Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(5 Pt 1):1533-40.
- (79) Bush A. Classification of phenotypes. *Pediatr Pulmonol Suppl*. 2004;26:30-3.
- (80) Cundall M, Sun Y, Miranda C, Trudeau JB, Barnes S, Wenzel SE. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(6):1064-71.
- (81) Ratjen F, Rietschel E, Griesse M, Ballmann M, Kleinau I, Doring G, et al. Fractional analysis of bronchoalveolar lavage fluid cytology in cystic fibrosis patients with normal lung function. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of anti-inflammatory treatment (BEAT) study group. *Eur Respir J*. 2000;15(1):141-5.
- (82) Chuang E, Zimmerman A, Neiswender KM, Liacouras CA. Sedation in pediatric endoscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2001;11(4):569-vi.
- (83) Clarkson K, Power CK, O'Connell F, Pathmakanthan S, Burke CM. A comparative evaluation of propofol and midazolam as sedative agents in fiberoptic bronchoscopy. *Chest*. 1993;104(4):1029-31.
- (84) Kristensen MS, Milman N, Jarnvig IL. Pulse oximetry at fibre-optic bronchoscopy in local anaesthesia: indication for postbronchoscopy oxygen supplementation? *Respir Med*. 1998;92(3):432-7.
- (85) de BJ, Marchac V, Scheinmann P. Complications of flexible bronchoscopy in children: prospective study of 1,328 procedures. *Eur Respir J*. 2002;20(5):1271-6.
- (86) Picard E, Schlesinger Y, Goldberg S, Schwartz S, Kerem E. Fatal pneumococcal sepsis following flexible bronchoscopy in an immunocompromised infant. *Pediatr Pulmonol*. 1998;25(6):390-2.
- (87) Heaney LG, Stevenson EC, Turner G, Cadden IS, Taylor R, Shields MD, et al. Investigating paediatric airways by non-bronchoscopic lavage: normal cellular data. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(7):799-806.
- (88) Riedler J, Grigg J, Stone C, Tauro G, Robertson CF. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(1):163-8.
- (89) Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(3 Pt 1):737-43.

-
- (90) Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B, et al. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):394-402.
- (91) Berry MA, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green RH, Brightling CE, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*. 2007.
- (92) Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, et al. Airway inflammation in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(7):798-803.
- (93) Helmers RA, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage in the nonimmunocompromised patient. *Chest*. 1989;96(5):1184-90.
- (94) Merchant RK, Schwartz DA, Helmers RA, Dayton CS, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage cellularity. The distribution in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(2):448-53.
- (95) Payne DN, Hubbard M, McKenzie SA. Corticosteroid unresponsiveness in asthma: primary or acquired? *Pediatr Pulmonol*. 1998;25(1):59-61.
- (96) James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J*. 2007;30(1):134-55.
- (97) Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B, et al. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):394-402.
- (98) Tillie-Leblond I, Gosset P, Tonnel AB. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy*. 2005;60(1):23-9.
- (99) Djukanovic R, Homeyard S, Gratziau C, Madden J, Walls A, Montefort S, et al. The effect of treatment with oral corticosteroids on asthma symptoms and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(3):826-32.
- (100) Pizzichini MM, Pizzichini E, Efthimiadis A, Clelland L, Mahony JB, Dolovich J, et al. Markers of inflammation in induced sputum in acute bronchitis caused by *Chlamydia pneumoniae*. *Thorax*. 1997;52(10):929-31.
- (101) Ferreira FA LCBAaHP. Gastroesophageal reflux and inflammation in bronchoalveolar lavage in children (Abstract). *Thorax*; 2003.
- (102) Kamada AK, Leung DY, Szefer SJ. Steroid resistance in asthma: our current understanding. *Pediatr Pulmonol*. 1992;14(3):180-6.

-
- (103) Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, Li AM, Nicholson AG, Wilson NM, et al. Is a two-week trial of oral prednisolone predictive of target lung function in pediatric asthma? *Pediatr Pulmonol.* 2005;39(6):521-7.
- (104) Grasemann H, Ratjen F. Different subgroups of difficult asthma in children. *Thorax.* 2001;56(11):895.
- (105) ten BA, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. "Refractory" eosinophilic airway inflammation in severe asthma: effect of parenteral corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(6):601-5.
- (106) Balzar S, Chu HW, Silkoff P, Cundall M, Trudeau JB, Strand M, et al. Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(1):110-7.
- (107) Paton J, Jardine E, McNeill E, Beaton S, Galloway P, Young D, et al. Adrenal responses to low dose synthetic ACTH (Synacthen) in children receiving high dose inhaled fluticasone. *Arch Dis Child.* 2006;91(10):808-13.
- (108) Priftis KN, Papadimitriou A, Gatsopoulou E, Yiallourous PK, Fretzayas A, Nicolaidou P. The effect of inhaled budesonide on adrenal and growth suppression in asthmatic children. *Eur Respir J.* 2006;27(2):316-20.
- (109) Balzar S, Chu HW, Strand M, Wenzel S. Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(5):431-9.
- (110) Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1360-8.
- (111) Kavanagh C, Saglani S, Wilson N. Management of children and adolescents with difficult asthma: experience of a tertiary referral centre. *Arch Dis Child;* 2006; 91:S54.

9. APÊNDICES

Dr P. PANTELIDIS**METHODS****1. BRONCHOALVEOLAR LAVAGE PREPARATION**

- 1) Collect cells in 200ml siliconised glass container.

[For a BAL collection bottle use glass media bottle. Siliconise glass by rinsing with dimethyldichlorosilane solution (2% in 1,1,1,-trichloroethane(BDH, cat no:) followed by normal washing with 2% to 5% deacon solution to remove HCl, good rinse with distilled H₂ O and sterilisation for 1 hour, 90°C, in oven.]

- 2) Take an aliquot and do a total cell count. **[note (a)]**

[This will give your pre-wash cell concentration and when multiplied with the BAL return volume, the pre-wash total number of cells]

- 3) Aliquot into 50ml conical bottom polypropylene tubes. [25ml aliquots]
- 4) Centrifuge at 1500rpm, 4°C, 10min.
- 5) Remove BAL fluid and resuspend the pellet from each tube with 2ml Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free HBSS containing Hepes (using a plastic pasteur pipette and gentle action); pool suspended cells into one 15 ml tube.
- 6) Make up to 15 ml with Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free HBSS containing Hepes.
[If sample is mucoid then see appendix.]
- 7) Centrifuge cell suspension at 1500-1700rpm, 4°C, 10min.
- 8) Remove and discard supernatant; resuspend the cell pellet with 2ml RPMI 1640 media initially and then make up to 4ml final volume with of RPMI 1640 media.

Remove two aliquots for total cell count **[note (a)]** and viability count **[note(b)]**.

NOTE (a): Total cell count: mix 100μl of cell suspension with 100μl (0.5% crystal violet solution) and count on haemocytometer.

NOTE (b): Viability count: mix 100μml of cell suspension with 100μml (trypan blue solution [diluted 1/5 with media] (sigma)) and count on haemocytometer.

1.1. Cytopreparations

1. Resuspend the cells to a final concentration of 0.5×10^6 cells/ml with RPMI1640 media and add 100ml to each of the 12 cytofunnels.

Note: *This is the standard procedure that you can use for samples from normal individuals and subjects with FA.*

For some preparations with high BAL lymphocyte content such as patients with sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis, it is advisable to increase the original cell concentration to $0.7-1.0 \times 10^6$ cells/ml. The reason for this, is so that you can avoid cell smears that appear to be due to the lysis of activated lymphocytes.

Similarly, if there appear to be a large number of squamous epithelial cells in the sample then is best that you reduce the cellular concentration.

One way of estimating the correct BAL cellular concentration that will give you a good cytopreparation spread, is by taking into account the different cell sizes while doing the total cell count in the haemocytometer. Thus cell that appear to be of regular size (ie macrophages) you count as 1, cells that appear to be of small size (i.e. lymphocyte, you count as 0.5) and cells that appear to be large (i.e. squamous epithelial cells, you count as 2).

eg. Microscope field with 4 lymphocytes 4 macrophages and 6 squamous epithelial cells would give you a normal count of 14 cells but for cytopreparation purposes, a count of $(2+4+12=18)$ cells.

2. Centrifuge the cells on to the slide (500rpm, 3min) and then dismantle.
3. Air-dry for 1 hour if they are to be used for differential count or immunocytochemistry.
4. For *in situ* air dry for 2 minutes and then fix with paraformaldehyde.

1.2. May-Grünwald-Giemsa stain for differential cell count

Solutions:

Giemsa R66 improved solution . From BDH cat: 35086 4X

May-Grunwald stain. From BDH cat: 35315 4B

Buffer pH 6.8 (Na /K phosphate 0.005M). Tablets from BDH cat: 33193 2D [Each table makes 1litre buffer. Dissolve 1 tablet in 50 ml dH₂O (i.e. 20x concentrated) and dilute to 1x conc. for use on the day]

Working solutions:

Dilute M-G (1:1) (v:v) with the Buffer(1x)

Dilute Giemsa (1: 16) (v:v) with the Buffer(1x [1 part Giemsa + 15 parts Buffer(1x)]

Keep both solution in polypropylene 50 ml tubes wrapped with aluminium foil. Change after 1 to 2 week.

METHOD

1. Fix air dried with methanol for 5 min at room temperature.

2. Immediately transfer into the M-G diluted stain and incubate for 5 min at room temperature
3. Immediately transfer into the Giemsa diluted stain and incubate for 15 min at room temperature
4. Immediately place into the buffer for 5 min
5. Wash with distilled water and air dry
6. At the end add a drop of D.P.X. (from BDH) mounting medium onto the cytopreparation and place a microscope coverslip (18x18mm) on top.
7. Do counts of 300-400 cells per cytopreparation.

1.3. Fixation for immunocytochemical studies

Following step 3 in section 1.1, immerse the microscope slides into a Coplin jar containing acetone/chloroform (1:1) and leave for 5 min.

Remove then the slides, air dry and store at -20°C.

1.4. Fixation for *in situ* hybridization

Prepare 4% paraformaldehyde solution in RNase free PBS pH 7.6 (Treated with DEPC). Place the paraformaldehyde with the PBS into a 50 ml polypropylene tube. Dissolve the paraformaldehyde by short 15 sec burst at the highest setting (with the lid loose) until it dissolves vortexing in between bursts.

1. After air drying the slides for (2-min maximum) in the laminae flow cabinet, place them into the paraformaldehyde solution and incubate at room temperature for 10 min.
2. After fixation, wash the slides in PBS for 5 min.
3. At this stage you can either :
  - (a) place the slides in 70% ethanol in RNase free water and store at 4°C
  - or
  - (b) dehydrate by subsequent immersions in 70%, 90% and 100% ethanol air dry wrap in cling film or place in microscope storage box and store at -80°C.

1.5. Preparation of slides for Electronmicroscopy

When this analysis is requested inform Ann Dewar in EM. One cytopreparation at high cellular concentration 1×10^6 cells/ml of the washed sample and one cytopreparation of the sample before washing should be made **on Perspex (plastic) slides**.

Air Dry and fix cytopreparations with a drop or two of 2.5% glutaraldehyde in PBS. for 3 min., then rinse with distilled water and air-dry before taking the sample in EM.

1.6. EM analysis for Asbestos bodies

Centrifuge 5-7 mls of the lavage sample and resuspend in 1 ml of 2.5% glutaraldehyde in PBS. Then take in EM.

2. APPENDIX

2.1. USING THE CYTOCENTRIFUGE FOR BAL SAMPLES

1. Write the lavage ILDU number on the slides with a pencil.
2. Place slide onto metal holder, label side upward.
3. Place filter (flat side down), then cytofunnel on top of the slide.
4. Clip the funnel, filter and slide in, making sure that the hole in the filter and cytofunnel line up (can be checked on the back)
5. Place holders into cytospin, making sure they are placed to balance, and pipette in your cells.
6. Press 'set time' then eg '2 - 5' (2 - 5 minutes) and ENTER
7. Press 'set speed' then eg '45' (450rpm) and ENTER
8. Make sure the lid is closed properly and press START
9. Once finished, take out the holders, and CAREFULLY unclip them, lift the filter and cytofunnel off the slide carefully, and take out your slide.
10. Turn off the cytospin once finished.
11. Throw the filters away into a CLINICAL HAZARDOUS WASTE BIN
12. Put the cytofunnels into a vercon or other disinfectant solution, rinse thoroughly under tap water then distilled water, leave to dry.

Royal Brompton Hospital and Harefield NHS Trust

PAEDIATRIC BRONCHOALVEOLAR LAVAGE REPORT

Patients name: _____ Hospital No:

Lab number: DOB:

Date of Bal Weight

Provisional diagnosis _____

BAL FUID

Volume in mls Total number of cells recovered x 10⁷ cells

Volume out mls Cellular Concentration x 10⁶ cells/ml

Post Wash Total number of cells recovered x 10⁷ cells

Cell viability %

Differential cell count results

Total cells counted

	Cells Count	Percentage%	Normal Range
Macrophages	____	____	>80%
Lymphocytes	____	____	<14%
Neutrophils	____	____	<4%
Eosinophils	____	____	<3%
Mast cells	____	____	<0.5%
Ciliated epithelial cells	____	____	
Squamous epithelial cells	____	____	

Debris/ Mucus

RBC

Inclusion Bodies

Haemociderin Ladened Macrophages

Fat Laden Macrophages

Comments:

Royal Brompton Hospital and Harefield NHS Trust**PATIENT PROTOCOL**Patients name: _____ Hospital No: Lab number: DOB: Date of Bal Weight

Provisional diagnosis _____

Bronchoscopy Procedure

Lavage only: YES/ NO

Biopsy : YES/NO

Site:-----

Volume in:-----

Recovery vol:-----

Vol. to microbiology:-----

Current Respiratory Problem

Brief History

- Fever: YES/NO
- Any antibiotics in the last 6 months: -----
- Any recent viral infection:-----
- Family atopy : father:-----
mother:-----
sibling:-----

Allergies

Immunology

Drugs near lavage

Lung function

Date:

FEV1	____	____	%	TLC	____	____	%
FVC	____	____		KCO	____	____	
TLC	____	____					

CT Date:

Chest X-Ray Date:

Microbiological Culture

Others: