

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PNEUMOLOGIA

ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
EM LACTENTES COM SIBILÂNCIA:
ANÁLISE DE IL-10 E CELULARIDADE NO
ASPIRADO NASOFARÍNGEO

PAULO MÁRCIO CONDESSA PITREZ

Orientadores: **Prof. Dr. Peter D. Sly e Prof. Dr. Fernando A. de Abreu e Silva**

Tese de Doutorado
PORTO ALEGRE – 2001

À minha esposa **Lyryss**, pelo apoio,
estímulo e compreensão constantes
nesta longa jornada.

Ao meu **pai**, pela importante participação
em todas as minhas conquistas,
sempre iluminando meus caminhos
com ética e razão.

Agradecimentos

À minha mãe, pelo carinho e especial incentivo durante toda a minha vida.

Ao meu avô Peri, por despertar, desde a minha infância, o interesse pelos valores intelectuais e éticos.

À minha família, pelo apoio e saudável convivência.

Ao Rogério Frajndlich, pelo contínuo apoio e estímulo durante todos esses anos.

Ao Prof. Fernando Abreu e Silva, por abrir-me a primeira porta para a vida acadêmica e pela orientação desta tese.

Ao Renato e ao Marcus, pela rica convivência no trabalho e constante estímulo.

Ao Prof. Peter Sly, pela preciosa orientação deste trabalho e relevante papel no meu crescimento profissional.

Ao grupo de pesquisa do Institute for Child Health Research de Perth, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Ao amigo Paulo Maróstica, pelos sempre valiosos conselhos profissionais.

Ao Prof. Goldim, pela revisão da análise dos dados.

À CAPES, pelo apoio financeiro deste meu projeto.

Ao Marco Aurélio, pelo inestimável auxílio a mim prestado neste curso.

À Dra. Ada Diehl, pela cordial colaboração no auxílio de alguns aspectos de citologia desta tese.

Aos pacientes e familiares que participaram deste estudo e cuja colaboração, como grupo, é essencial para o progresso da ciência.

“Duvidando, chegamos à verdade” (Cícero, 106 a.C.- 43 a..C.)

“É possível que, em termos de destino, o homem valha mais pela profundidade de suas perguntas do que por suas respostas.” (André Malraux, 1901-1976)

Sumário

Lista de Abreviaturas	7
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tabelas	9
Resumo	10
Abstract.....	11
1 Introdução	12
1.1 Fenótipos de sibilância no lactente	13
1.2 Infecção respiratória viral e sibilância no lactente.....	15
1.3 Resposta imune à infecção por vírus respiratórios	18
1.3.1 Inflamação.....	18
1.3.2 Imunidade inata.....	20
1.3.2.1 Neutrófilos	21
1.3.2.2 Eosinófilos	23
1.3.3 Citocinas	26
1.3.3.1 IL-10	27
1.4 Métodos de avaliação da resposta inflamatória do aparelho respiratório	29
2 Justificativa	32
3 Objetivos.....	33
4 Casuística e Métodos	34
4.1 Seleção da Amostra.....	34
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Questionário	37
4.2.2 Critério de gravidade.....	38
4.2.3 Exame físico.....	39
4.2.4 Aspirado nasofaríngeo	39
4.2.5 Virologia	40
4.2.6 Contagem total de células	41
4.2.7 Citologia diferencial.....	42
4.2.8 Mensuração de IL-10	43
4.2.9 Seguimento dos pacientes	44

4.3	Análise estatística.....	44
4.4	Ética	44
5	Resultados.....	45
5.1	Níveis de IL-10:	45
5.2	Correlação ou diferença dos níveis de IL-10 no aspirado nasofaríngeo com outras variáveis do estudo:.....	46
5.3	Exame citológico do aspirado nasofaríngeo:	47
5.4	Virologia:	50
5.5	Método do aspirado nasofaríngeo.....	51
6	Discussão	52
7	Conclusões	60
8	Referências Bibliográficas.....	61
	ANEXO 1.....	70
	ANEXO 2.....	71
	ANEXO 3.....	74

Lista de Abreviaturas

ANF: aspirado nasofaríngeo

BVA: bronquiolite viral aguda

DOB: doença obstrutiva brônquica

ELISA: ensaio imunoenzimático

IgE: imunoglobulina E

IL: interleucina

INF- γ : interferon- γ

IRV: infecção respiratória viral

IVAS: infecção de vias aéreas superiores

PBS: solução salina tamponada

PCE: proteína catiônica eosinofílica

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

SNF: secreção nasofaríngea

SR: sibilância recorrente

Th: T-helper

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

VSR: vírus sincicial respiratório

Lista de Figuras

- Figura 1 – Fisiopatogenia da sibilância do lactente secundária à infecção por VSR .. p. 20
- Figura 2 – Cateter de aspirado nasofaríngeo. p. 40
- Figura 3 – Diferença entre neutrófilo e eosinófilo pela coloração de Leishman. p. 42
- Figura 4 – Comparação das medianas das concentrações de IL-10 no ANF, entre os grupos estudados. p. 46
- Figura 5 - Exame citológico com predominância de neutrófilos no ANF de um lactente com bronquiolite viral aguda. p. 47
- Figura 6 – Comparação das medianas do número total de células no ANF. p. 50

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas entre os grupos do estudo. p .36

Tabela 2 - Contagem total de células e citologia diferencial do ANF entre os grupos. p. 49

Resumo

Episódios de sibilância secundários a infecções respiratórias virais são comuns nos primeiros anos de vida. Contudo, sua patogênese e relação com o posterior surgimento de asma permanecem ainda pouco esclarecidos. Com o objetivo de analisar a resposta celular e da IL-10 em lactentes com sibilância, foram analisadas amostras de aspirado nasofaríngeo de 71 lactentes. Os pacientes foram classificados em três grupos: primeiro episódio de sibilância (n=36), sibilância recorrente (n=18) e infecção de vias aéreas superiores (n=17). O exame citológico da secreção nasofaríngea demonstrou uma predominância de neutrófilos em todos os grupos. Não foi evidenciada a presença de eosinófilos na secreção nasofaríngea de nenhum paciente, exceto em um caso do grupo de sibilância recorrente, cujo percentual dessas células foi de 1%. Foram encontrados níveis de IL-10 significativamente aumentados no aspirado nasofaríngeo do grupo com primeiro episódio de sibilância, quando comparados ao grupo de infecção de vias aéreas superiores ($p=0,017$). Não foi encontrada correlação significativa entre os níveis de IL-10 em secreção nasofaríngea e gravidade do episódio de sibilância. Conclui-se que os neutrófilos são as células que predominam na resposta inflamatória em lactentes com sibilância secundária à infecção respiratória viral e que a IL-10 pode ser uma citocina com participação importante na predisposição à doença obstrutiva brônquica do lactente.

Abstract

Wheezing in infancy during viral respiratory infections is common. However, the pathogenesis and the relationship with the development of asthma later in life are not well understood. The aim of this study was to evaluate the cellular pattern and IL-10 responses in nasopharyngeal secretions in these patients. Seventy one children were recruited and classified in 3 groups: first episode of wheezing (n=36), recurrent wheezing (n=18) and upper respiratory tract infections (n=17). Neutrophils were the predominant cells in cytologic analysis. Except in one recurrent wheezing infant, which accounted for 1% of the total cells, no eosinophils were detected in any sample. The IL-10 concentrations in nasopharyngeal samples from infants with the first episode of wheezing were significantly greater than those in samples obtained from patients with upper respiratory tract infections ($p=0,017$). There was no correlation between IL-10 levels and severity of the wheezing episodes. We conclude that neutrophils are the predominant cells in the airways of wheezy infants with viral respiratory infections and we suggest that IL-10 may play an important role in the pathogenesis of obstructive airway disease of infancy.

1 Introdução

A ocorrência de episódios de sibilância no lactente e na criança maior apresenta um caráter prevalente em todo o mundo. Até os seis anos de idade, 50% das crianças apresentam, pelo menos, um episódio de sibilância (MARTINEZ et al., 1995). Sibilância é o som audível, contínuo e de alta frequência, resultante de uma limitação ao fluxo aéreo, por obstrução mecânica parcial das vias aéreas inferiores. Os fatores que podem causar obstrução brônquica intermitente são vários, sendo que a maioria, provavelmente, associada a diferentes fatores ou mecanismos de resposta inflamatória. A sibilância nos primeiros anos de vida está mais frequentemente associada a infecções respiratórias virais, principalmente pelo vírus sincicial respiratório (VSR). Sua relação com os mecanismos de resposta alérgica (atopia) é pouco clara nessa faixa etária (WILSON et al., 1992; SIGURS et al., 2000). Por outro lado, a sibilância na criança maior está mais claramente associada à asma e atopia, estas desencadeadas por alérgenos, vírus respiratórios e outros irritantes. A relação entre episódios de sibilância nos primeiros anos de vida, causados na maioria das vezes por infecção por VSR, e posterior desenvolvimento de asma, permanece também indefinida. Contudo, atualmente, parece claro que a sibilância do lactente apresenta, na verdade, distintas causas, fenótipos e prognóstico. A asma alérgica, descrita como uma doença caracterizada pela clássica reação de hipersensibilidade tipo I, mediada por Imunoglobulina E (IgE) e com intermitentes episódios de broncoconstrição, parece não ser a causa predominante de sibilância nos primeiros anos de vida (MARTINEZ et al., 1995). Além disso, existem evidências de que em algumas crianças, infecção de vias aéreas inferiores por VSR nos

primeiros anos de vida, seja um fator de risco independente para o desenvolvimento de asma relacionada a atopia na criança maior (STEIN et al., 1999).

1.1 Fenótipos de sibilância no lactente

As publicações referentes à coorte do grupo de Tucson, a partir do final da década de 80, mudaram de modo significativo o entendimento da doença obstrutiva brônquica (DOB) na infância. Os resultados dos estudos desta coorte (MARTINEZ et al. 1988; MARTINEZ et al., 1995), demonstraram existir diferentes fenótipos de lactentes sibilantes. A partir destes achados, os lactentes sibilantes foram divididos em 3 grupos e classificados da seguinte forma: sibilância transitória precoce (pelo menos um episódio de sibilância nos primeiros três anos de idade e ausência de sibilância aos seis anos), sibilância de início tardio (ausência de sibilância antes dos três anos, mas presença de sibilância aos seis anos) e sibilância persistente (episódios de sibilância antes dos três anos de idade e presentes aos seis anos). A maioria dos lactentes com episódios de sibilância, nesse estudo, apresentavam infecção por VSR ou parainfluenza.

Desta forma, a população de lactentes sibilantes parece apresentar diferentes padrões de resposta imune e diferentes fatores de risco. Segundo MARTINEZ et al. (1995), a maioria das crianças com sibilância nos primeiros três anos de idade torna-se assintomática aos seis anos de idade (sibilância transitória precoce). Este grupo apresenta, como característica principal, uma reduzida função pulmonar quando aferida nos primeiros meses de vida, antes do aparecimento de qualquer sintoma respiratório. Assim, pode-se especular que lactentes com valores de função pulmonar nos limites inferiores da normalidade já ao nascimento (vias aéreas de calibre menor) têm maior

predisposição a apresentar episódios recorrentes de sibilância somente nos primeiros anos de vida, relacionados a infecções respiratórias virais. Se não for associada a outros fatores de risco para atopia, esta condição tende a ser transitória, melhorando de acordo com o crescimento da via aérea. Contudo, a função pulmonar deste grupo parece ainda não apresentar valores normais aos seis anos de idade, apesar do desaparecimento dos sintomas de sibilância (MARTINEZ et al., 1995).

Um grupo menor, mas nem por isso menos importante em um contexto populacional, é o daqueles lactentes incluídos no grupo de sibilância persistente. Este grupo apresenta valores de função pulmonar, nos primeiros meses de vida, semelhantes ao do grupo que nunca sibilou. Porém, tais valores tornam-se reduzidos aos seis anos de idade. Encontrou-se também, nesse grupo, uma relação direta entre sibilância persistente e IgE elevada aos nove meses de idade (MARTINEZ et al., 1995). Este grupo parece representar os pacientes asmáticos atópicos, com início precoce da doença.

Por último, o grupo com sibilância de início tardio preenche melhor as características do padrão de asma relacionada a atopia, já bem documentada pela literatura.

Outros estudos de coorte encontraram resultados semelhantes e complementares à coorte de Tucson, reforçando tal hipótese. YOUNG et al. (1995, 2000), a partir de uma coorte realizada em Perth, com um delineamento similar ao estudo de Tucson, também demonstraram uma reduzida função pulmonar, antes do primeiro episódio de sibilância, naqueles lactentes com sibilância transitória precoce. Além disso, WILSON et al. (1992) demonstraram que lactentes com sibilância nos primeiros anos de vida, associada à infecção respiratória, parecem apresentar uma hiper-responsividade

brônquica maior do que a de pacientes atópicos, sugerindo um mecanismo de DOB diferente daquele do atópico.

Pelas observações anteriores, pode-se admitir a hipótese de que existem, pelo menos, dois tipos de lactente sibilante nos primeiros anos de vida. O primeiro grupo, predominante, apresenta uma redução constitucional da função pulmonar, predispondo a episódios de sibilância nos primeiros anos de vida relacionados a infecções respiratórias virais, mas com um bom prognóstico. Esta diminuição da função pulmonar pode ser causada por uma redução anatômica do calibre das vias aéreas e/ou por uma alteração da regulação do tônus desta, associada à inflamação secundária a infecção respiratória viral (IRV). O outro grupo, com sintomas de sibilância recorrente (SR) ou então sintomas persistentes, apresenta deterioração da função pulmonar nos primeiros seis anos de vida, a qual pode estar associada a mecanismos de inflamação brônquica, provavelmente de origem atópica.

1.2 Infecção respiratória viral e sibilância no lactente

O VSR é responsável pela maioria dos episódios de sibilância nos primeiros dois anos de vida. Vírus da parainfluenza, da influenza e adenovírus são os outros agentes etiológicos mais freqüentemente envolvidos (DUBOIS & RAY, 1999).

O VSR, devido à sua indiscutível importância epidemiológica, é o vírus mais estudado nesse grupo de pacientes.

O VSR é um vírus RNA, da família do pneumovírus. Foi isolado, pela primeira vez, em um chimpanzé, em 1955. Dois subgrupos foram posteriormente identificados: A e B. As glicoproteínas F e G, da sua estrutura, parecem estar diretamente

associadas à indução de resposta imune. O VSR é responsável por epidemias anuais de doença respiratória (EVERARD, 1999). Seu impacto clínico é maior nos primeiros dois anos de vida, sendo responsável pela maioria dos casos de bronquiolite viral aguda (BVA). A infecção por VSR é ainda a causa mais freqüente de doença das vias aéreas inferiores em crianças menores de cinco anos. Virtualmente, todas as crianças apresentarão pelo menos uma infecção por VSR nos primeiros dois anos de vida (GLEZEN et al., 1986). Outra característica peculiar do VSR é sua capacidade de causar infecções recorrentes, em intervalos de até poucos meses, mas com progressiva diminuição da gravidade das infecções (HENDERSON et al., 1979; HALL et al., 1991). Estes achados demonstram que a proteção à infecção ao VSR não é completa e é de curta duração, não se sabendo ainda porque o sistema imune é incapaz de proteger o indivíduo de uma nova infecção, até mesmo em curto período de tempo. No primeiro ano de vida, durante o inverno, o VSR é responsável por até 80% dos casos de BVA. A partir de dados referentes a países desenvolvidos, pode-se ter um amplo panorama da epidemiologia e importância da infecção por VSR. O período de incubação é de três a oito dias. As mãos são importantes vetores de transmissão. Lactentes são portadores do vírus por vários dias após a alta hospitalar. Da mesma forma, julga-se que adultos e crianças maiores são potenciais fontes de contágio por vários dias após o término dos sintomas (EVERARD, 1999).

A maioria dos lactentes com infecção por VSR apresentam infecções de vias aéreas superiores (IVAS). Contudo, aproximadamente 10% dos casos vão apresentar envolvimento de vias aéreas inferiores. Destes casos, estima-se que entre 0,5% e 1,5% é admitido ao hospital durante o inverno. Dos pacientes internados, cerca de 5-8%

necessitam de ventilação mecânica (GIUGNO, 2000; DUBOIS & RAY, 1999). A mortalidade de pacientes hospitalizados encontra-se entre 0,5% e 1,5%. O VSR oferece um risco significativamente maior a pacientes com cardiopatia congênita, doença pulmonar crônica, imunodeficiência ou prematuridade (EVERARD, 1999; DUBOIS & RAY, 1999).

Do ponto de vista clínico, a bronquiolite viral aguda pode ser definida como uma infecção das vias aéreas inferiores, em crianças menores de dois anos, acompanhada de graus variáveis de obstrução brônquica. Sintomas de IVAS, durante 2-3 dias, precedem um quadro de dificuldade respiratória variável, acompanhada de sibilância. Em lactentes jovens, pode predominar a presença de crepitações na ausculta pulmonar, com ausência de sibilos. O diagnóstico é essencialmente clínico. As anormalidades radiológicas mais freqüentes são: hiperinsuflação pulmonar difusa, infiltração peri-hilar e atelectasias segmentares ou lobares (EVERARD, 1999; DUBOIS & RAY, 1999).

Em relação à resposta imunológica à infecção por VSR, existe um vasto número de publicações a respeito, discutindo e apresentando resultados sobre diferentes características de tal resposta e sua correlação com quadro clínico, gravidade e prognóstico. Além disso, a possível relação da infecção por VSR e posterior desenvolvimento de asma é ainda um assunto bastante obscuro e, ao mesmo tempo, fascinante.

1.3 Resposta imune à infecção por vírus respiratórios

O VSR tem sido foco de intensa pesquisa, nos últimos 30 anos, devido às suas particularidades epidemiológicas e imunológicas. Em relação à resposta imune, quatro aspectos merecem destaque: primeiro, o VSR é capaz de causar infecção em lactentes jovens, mesmo na presença de anticorpos neutralizantes maternos; segundo, freqüentemente não há imunidade completa induzida por infecção natural pelo VSR, embora infecções subseqüentes sejam progressivamente de menor gravidade; terceiro, existe uma relação nítida entre infecção por VSR e SR; e, quarto, uma vacina experimental, inativada por formalina, paradoxalmente resultou em infecções mais graves nos pacientes que a receberam do que no grupo não vacinado (KIMPEN, 1996). Todas essas considerações sobre a resposta imunológica, somadas às importâncias epidemiológico-clínicas da IRV no lactente com sibilância, justificam o esforço constante da comunidade científica para buscar um maior entendimento deste assunto.

Analisando alguns aspectos particulares da resposta imune, destacam-se:

1.3.1 Inflamação

Pode ser definida como uma resposta protetora inespecífica de tecidos vascularizados a qualquer dano. Uma das características histológicas principais da resposta inflamatória é o acúmulo, nos tecidos, de células do sistema imune. Associadas à presença dessas células, várias outras substâncias estão envolvidas: mediadores, citocinas, proteínas de fase aguda, proteínas do sistema complemento etc. (LARSEN & HOLT, 2000). A inflamação é considerada componente central do mecanismo causador de obstrução brônquica no lactente, mesmo levando-se em conta a importância de outros fatores de risco que possam estar associados, como o calibre e complacência da via aérea.

O princípio básico pelo qual uma infecção viral se estabelece é a presença de replicação microbiana e sua citotoxicidade. Existem, porém, mecanismos imunológicos e não imunológicos adicionais importantes, que tornam certos indivíduos mais ou menos susceptíveis que outros ao desenvolvimento de doença. Quase todos os componentes do sistema imune têm-se mostrado envolvidos na complexa fisiopatogenia da sibilância do lactente, secundária à infecção pelo VSR (Figura 1) (VAN SCHAIK et al., 2000). Diferentes autores têm responsabilizado diferentes células ou marcadores inflamatórios como principal causa dos sintomas, da maior gravidade e/ou da recorrência dos episódios de sibilância. Os motivos pelos quais determinados grupos de lactentes com IRV apresentam comprometimento de vias aéreas inferiores, ou episódios mais graves de BVA ou SR, ainda permanecem bastante obscuros. Algumas células, interleucinas (IL) e mediadores inflamatórios têm sido considerados, de forma controversa na literatura, como os principais responsáveis pela gênese da sibilância no lactente, secundária a IRV. Eosinófilos, neutrófilos, linfócitos Th1/Th2, IL-10, IL-8, IgE específica para VSR, leucotrienos, INF- γ , IL-6 e IL-2 são as células, citocinas e mediadores inflamatórios mais estudados (WELLIVER, 2000; EVERARD, 1999; ROMÁN et al., 1997; GIUGNO, 2000). No futuro, o melhor entendimento da fisiopatogenia da sibilância do lactente pode trazer importantes benefícios, terapêuticos ou de prevenção, para este problema tão prevalente e importante em todo o mundo. Além do mais, a detecção precoce de padrões diferentes de resposta imune a infecções virais, nesses pacientes, através de marcadores específicos, já no primeiro episódio de sibilância, pode ajudar a prever quem desenvolverá sibilância persistente.

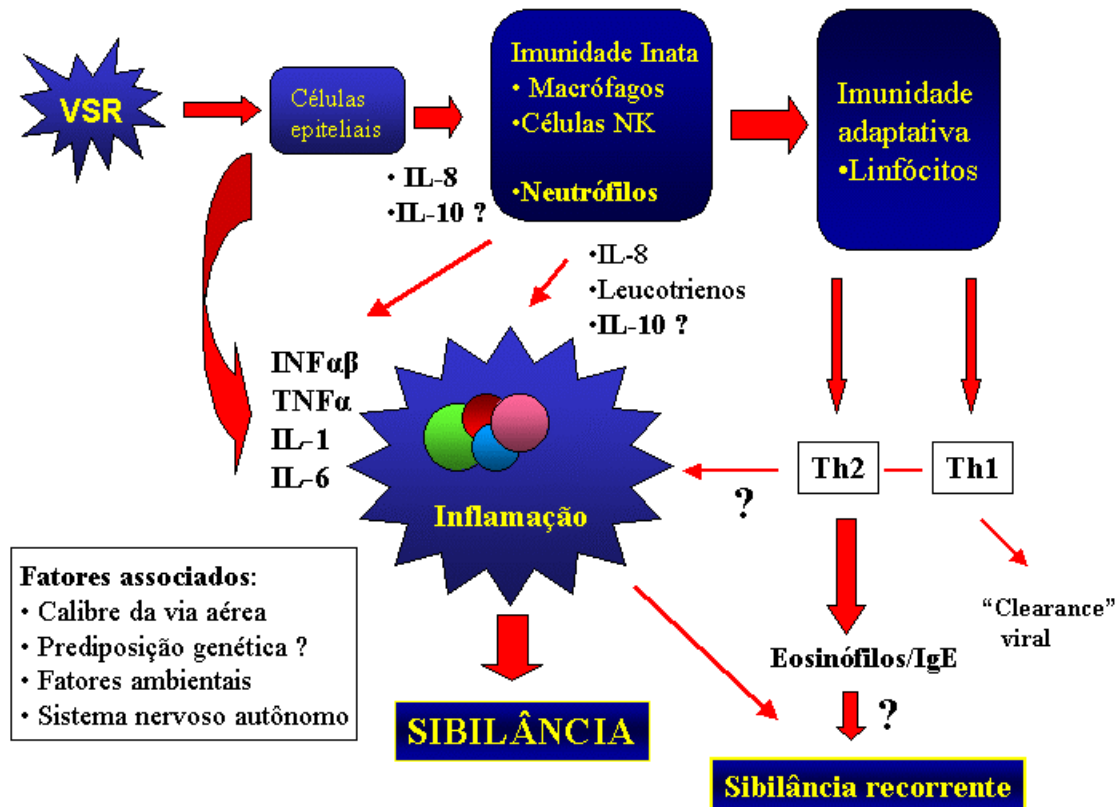


Figura 1 – Fisiopatogenia da sibilância do lactente secundária à infecção por VSR (adaptado de VAN SCHAİK et al., 2000).

1.3.2 Imunidade inata

A resposta imune tem sido dividida, tradicionalmente, em imunidade inata e adaptativa. O componente adaptativo envolve duas células principais: linfócitos T e B. A expansão clonal de linfócitos, em resposta a uma infecção, é essencial para gerar uma eficiente resposta imune. Porém, três a cinco dias são necessários para que um número suficiente de células clonais sejam produzidas e diferenciadas em células efetoras. Este período, na verdade, permitiria que um patógeno causasse dano significativo ao hospedeiro. Por outro lado, a imunidade inata, que inclui peptídeos antimicrobianos, fagócitos e sistema de complemento, é ativada de uma forma inespecífica e imediata,

logo após o início de uma infecção. Portanto, conter o patógeno através de uma resposta inflamatória, até que o sistema adaptativo se torne operante, tem sido considerada a principal função da imunidade inata. Por esta razão, especula-se que as células e sistemas envolvidos na imunidade inata possam ser também responsáveis por grande parte da patologia e dos sintomas das infecções, inclusive aquelas que causam sibilância no lactente (JANEWAY et al., 1997a; MEDZHITOV & JANEWAY, 2000).

1.3.2.1 Neutrófilos

De todos os componentes da imunidade inata, o neutrófilo tem sido considerado, por alguns grupos de pesquisa nesta área, um provável e importante causador da doença obstrutiva brônquica do lactente, secundária a IRV. Tipo de leucócito mais abundante no sangue, este fagócito polimorfonuclear originado na medula óssea, é uma das células centrais da resposta inflamatória aguda. Embora um papel protetor do neutrófilo contra infecções bacterianas esteja já bem estabelecido, várias evidências sugerem que o neutrófilo pode também ser importante no mecanismo de defesa antiviral. Tais evidências foram demonstradas em relação a: quimiotaxia, aderência, fagocitose, ativação do metabolismo oxidativo e complexos imunes virais (FADEN & OGRA, 1986). Outros achados interessantes são a relação entre a resposta neutrofílica e infecção por rinovírus, que é a causa mais comum de IVAS em qualquer faixa etária (TURNER, 1990). Existe uma relação entre sintomas e maior influxo de neutrófilos nas vias aéreas superiores de pacientes com infecção por rinovírus, comparado ao grupo de assintomáticos e pacientes não infectados (WINTHER et al., 1984; NACLERIO et al., 1988). A partir dessas evidências, a possibilidade do neutrófilo poder exercer um papel

importante na defesa e resposta inflamatória na IRV pode mudar o entendimento da fisiopatogenia da sibilância nos primeiros anos de vida.

Em relação a IRV e sibilância, já em 1984, FADEN et al. (1984) demonstraram um predomínio de neutrófilos nas vias aéreas de lactentes com BVA, constituindo mais de 70% das células presentes no aspirado nasofaríngeo. Em 1994, EVERARD et al. (1994) desenvolveram um estudo analisando a citologia diferencial do aspirado nasal e lavado brônquico de 20 e 14 lactentes, respectivamente, com bronquiolite viral aguda por VSR. Os resultados foram de um predomínio de neutrófilos tanto no aspirado nasal (mediana: 93%, interquartil: 90,5-94%) como no lavado brônquico (mediana: 76%, interquartil: 71-85%). Neste estudo, os eosinófilos representavam menos de 1% das células presentes no de lavado brônquico, encontrado em somente 8 pacientes, e nenhum eosinófilo foi encontrado em amostras de aspirado nasofaríngeo. SHEERAN et al. (1999) também detectaram um predomínio de neutrófilos no aspirado nasal (mediana: 96%, intervalo: 42-100%) e lavado traqueal (mediana: 97%, intervalo: 10-100%) em lactentes com bronquiolite viral aguda por VSR, não evidenciando a presença de eosinófilos em nenhum caso. Em um estudo onde se realizou lavado bronco-alveolar em vários grupos de pacientes pediátricos (grupo controle, fibrose cística, asma, lactente sibilante e tosse crônica), o grupo dos lactentes sibilantes apresentou um percentual de neutrófilos significativamente maior do que o dos pacientes com asma e grupo controle (MARGUET et al., 2000).

Além disto, em três estudos experimentais *in vitro*, complexos imunes de VSR ao reagir com neutrófilos humanos provocaram uma significativa contração de musculatura lisa de íleo de porco da índia e liberação de radicais de oxigênio e produtos

do metabolismo do ácido araquidônico (KAUL et al., 1982; FADEN et al., 1983; ARNOLD et al., 1994). Estes achados demonstram que o efeito dos vírus respiratórios sobre as vias aéreas, através de seus anticorpos, no caso o VSR, pode desencadear uma resposta inflamatória pelos neutrófilos.

É interessante mencionar, ainda, que a resposta inflamatória parece apresentar características dependentes da idade (LARSEN & HOLT, 2000). Em relação à BVA, sua incidência em recém-nascidos é pequena, apresentando-se de forma leve ou atípica (HALL et al., 1979). Coincidentemente, as funções celulares dos neutrófilos estão diminuídas nesta faixa etária (FALOON & GALLIN, 1986). Com estas considerações, seria de se supor que um recém-nascido deveria apresentar quadros mais graves de BVA. Portanto, deve existir algum outro mecanismo protetor no período neonatal (anticorpos maternos) que desapareceria após algumas semanas.

Assim, com as evidências de uma predominância de neutrófilos nas vias aéreas em lactentes com sibilância secundária a IRV e estudos experimentais demonstrando uma resposta efetora do neutrófilo provocada pelo VSR, pode ser interessante comparar essa resposta inflamatória entre diferentes grupos de lactentes com sibilância e um grupo controle.

1.3.2.2 Eosinófilos

Os eosinófilos são granulócitos derivados da medula óssea, cujo nome provém do aspecto dos seus grânulos que contém proteínas básicas que se coram com o corante ácido eosina. A maioria dos eosinófilos localiza-se predominantemente nos tecidos (respiratórios, gastrointestinais e uro-genitais), com reduzido número no sangue. Estas células desempenham duas principais funções efetoras: a primeira é através da

liberação de proteínas granulares e radicais ácidos altamente tóxicos, que podem combater microorganismos e parasitas, mas que também podem causar dano tecidual durante reações alérgicas; a segunda é através da produção de vários mediadores inflamatórios e citocinas que ampliam a resposta inflamatória, recrutando mais eosinófilos, leucócitos e células epiteliais (JANEWAY et al., 1997b). Dentre as proteínas granulares do eosinófilo, uma das mais estudadas é a proteína catiônica eosinofílica (PCE). Esta proteína é tóxica para bactérias (LEHRER et al., 1989) e parasitas (DAVID et al., 1980) e causa dano celular epitelial e edema de epitélio respiratório (MOTOJIMA et al., 1989; YOUNG et al., 1986). Além disso, ela se encontra aumentada nas secreções respiratórias de pacientes com asma, estando inclusive associada à gravidade da asma (BOUSQUET et al., 1990).

A importância do eosinófilo na patogênese da asma está relacionada ao seu papel central no processo inflamatório das vias aéreas, junto com os linfócitos. Esta participação já está bem documentada na literatura. Um aumento de eosinófilos foi demonstrado em escarro (FRIGAS et al., 1981), lavado bronco-alveolar (DE MONCHY et al., 1985) e epitélio respiratório (BEASLEY et al., 1989) de pacientes com asma. Além disso, acredita-se, atualmente, que eles sejam responsáveis por várias características da asma, tais como: lesão e descamação do epitélio respiratório (STEIN & MARTINEZ, 1999), reação asmática tardia induzida por alérgeno (GIBSON et al., 1991) e hiper-responsividade das vias aéreas (WARDLAW et al., 1988). No entanto, seu papel patogênico, em relação ao grupo de lactentes com sibilância, ainda é bastante controverso.

Em relação a lactentes com sibilância e IRV, vários estudos detectaram níveis elevados de PCE presentes nas vias aéreas, inclusive mostrando uma correlação com a gravidade dos episódios (GAROFALO et al., 1992; GAROFALO et al., 1994; INGRAM et al., 1995; REIJONEN et al., 1997). GAROFALO et al. (1992) foram os primeiros a publicar um estudo onde observaram um aumento da PCE na secreção nasal de lactentes com BVA, sugerindo um importante papel do eosinófilo nesse grupo de pacientes. SIGURS et al. (1994), entretanto, não encontraram uma relação de níveis elevados de PCE nesses pacientes com o posterior surgimento de sibilância recorrente. MARTINEZ et al. (1998) demonstraram uma marcante resposta eosinopênica em lactentes com sibilância transitória precoce, sugerindo que este grupo deve apresentar uma resposta imune particular quando comparada ao grupo de asmáticos de origem atópica. Entretanto, EHLENFIELD et al. (2000), em um estudo retrospectivo, demonstraram que o aumento de eosinófilos no sangue, durante o episódio de BVA, pode predizer a ocorrência de sintomas de asma aos sete anos de idade.

Existem evidências de que os níveis da PCE estejam bem mais elevados nas vias aéreas do que no sangue (GAROFALO et al., 1994; INGRAM et al., 1995), sugerindo uma atividade superior dos eosinófilos nos tecidos, se comparada à das células circulantes. Entretanto, curiosamente, os poucos estudos que analisaram o tipo de célula inflamatória presente no aparelho respiratório dos lactentes com BVA, não encontraram, neste local, um número significativo de eosinófilos, como foi mencionado anteriormente (FADEN et al., 1984; EVERARD et al., 1994; SHEERAN et al., 1999). Além disso, um estudo de necropsia em lactentes com BVA grave não descreve a presença de eosinófilos no tecido pulmonar (AHERNE et al., 1970). Esses achados são paradoxais, pois no local

onde existe uma “atividade inflamatória” importante em relação aos eosinófilos, como indicado pelos níveis elevados de PCE, deveria haver uma presença considerável desta célula. Isto parece tão paradoxal, que Robert Welliver, um dos autores que acredita que o eosinófilo exerça um papel importante na fisiopatogenia da sibilância do lactente secundária a IRV, em um de seus artigos de revisão sobre o assunto, chega a admitir que o eosinófilo, nesses pacientes, deve ser “uma célula degranulada não visível” nas vias aéreas (WELLIVER, 2000).

Em resumo, no que se refere à participação do eosinófilo na fisiopatogenia da sibilância do lactente, pode-se inferir dois pontos importantes: o primeiro, de que a única evidência mais consistente na literatura, em relação à presença de atividade eosinofílica em lactentes sibilantes, é a elevada concentração de PCE na secreção nasofaríngea e no sangue nesses pacientes; o segundo, de que estudar esse grupo de pacientes, sem diferenciar os grupos em relação ao primeiro episódio de sibilância e SR, pode-se estar incorrendo no erro de se estudar vários fenótipos em um mesmo grupo, dificultando a distinção das diferentes respostas imunes entre esses pacientes.

1.3.3 Citocinas

Citocinas são usualmente proteínas sinalizadoras extracelulares. Elas são produzidas por diferentes tipos de células que estão envolvidas em interações célula-célula, agindo através de receptores específicos localizados na superfície das células-alvo. Como um grupo, estas proteínas induzem crescimento, diferenciação, quimiotaxia, ativação e/ou aumento da citotoxicidade de células de vários tecidos. O termo interleucina foi originalmente utilizado para citocinas produzidas por leucócitos, embora,

atualmente, se saiba que várias citocinas são produzidas também por outros tipos de células (CHUNG & BARNES, 1999).

Existe um apreciável número de estudos demonstrando a participação de vários mediadores e citocinas na fisiopatogenia de lactentes com sibilância causada por uma IRV. Considerando todas as evidências anteriormente apresentadas da possível importância da resposta neutrofílica nos lactentes com sibilância, existe uma citocina que pode apresentar uma estreita relação com os sintomas e predisposição de sibilância nesta faixa etária e, portanto, merece ser investigada. Esta citocina é a IL-10.

1.3.3.1 IL-10

A IL-10 é uma das citocinas com características antiinflamatórias mais destacadas do sistema imune humano. Produzida por várias células do sistema de defesa (linfócitos Th0/Th1/Th2, linfócitos T citotóxicos e monócitos/macrófagos ativados), além de apresentar características de atividade Th2, ela também é uma potente inibidora da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos/macrófagos (CHUNG & BARNES, 1999; OPAL & DEPALO, 2000). Os linfócitos Th2 produzem citocinas (IL-4, IL-5, IL-3) que estimulam a resposta mediada pela IgE e por eosinófilos. Por outro lado, as células Th1 são responsáveis pela resposta inflamatória celular, através da produção de citocinas como INF- γ , IL-2 e IL-12 (MOSMANN & SAD, 1996). Segundo OPAL et al. (1998), a IL-10 também inibe a apresentação de antígenos. Além disto, níveis elevados de IL-10 no sangue estão associados a mortalidade por doença meningocócica (LEHMANN et al., 1995; WESTENDORP et al., 1997). Por outro lado, níveis baixos de IL-10 no pulmão aumentam o risco de síndrome da distrição respiratória do adulto (DONNELLY et al., 1996). Como pode ser evidenciado por esses dados, diferentes respostas de IL-10

podem ter tanto um papel protetor em relação a infecções e danos teciduais ao hospedeiro, como podem torná-lo suscetível a respostas inflamatórias exacerbadas.

Em relação à resposta inflamatória a infecções, alguns estudos demonstraram que a IL-10 parece regular várias atividades e funções do neutrófilo (CASSATELA, 1998). A IL-10 inibe a secreção de TNF- α , IL-1- β e IL-8 pelos neutrófilos (CASSATELA et al., 1993). Outro estudo, em camundongos sensibilizados com albumina de ovo, demonstrou também que IL-10, de forma dose-dependente, diminui o influxo de neutrófilos e eosinófilos nas vias aéreas (ZUANY-AMORIM et al., 1995). Poucos grupos estudaram a resposta a IL-10 em lactentes com sibilância. SHEERAN et al. (1999) demonstraram que os níveis de IL-10 em aspirado nasal e lavado traqueal estão significativamente aumentados em pacientes com bronquiolite viral aguda por VSR, quando comparados a um grupo controle de lactentes saudáveis, encontrando, contudo, uma correlação negativa com gravidade da BVA. Por outro lado, VAN SCHAİK et al. (1999) não encontraram diferença dos níveis de IL-10 na secreção nasofaríngea, entre grupos de BVA, SR, IVAS e controle. BONT et al. (2000), em um estudo em lactentes com primeiro episódio de sibilância, demonstraram que este grupo de pacientes apresentou uma elevada produção de IL-10 em monócitos isolados *in vitro*, no período de convalescença, comparado a um grupo controle, e que esta elevação se correlaciona positivamente com sibilância no futuro.

Esses estudos apontam para diferentes respostas na produção de IL-10, em lactentes com infecção respiratória viral, onde poderia haver uma alteração da atividade funcional dos neutrófilos, cuja resposta contribuiria para predisposição de infecções de vias aéreas inferiores, episódios de sibilância mais graves e/ou de sibilância recorrente.

1.4 Métodos de avaliação da resposta inflamatória do aparelho respiratório

O entendimento da resposta inflamatória das vias aéreas é essencial para o melhor conhecimento da fisiopatogenia e para avanços no diagnóstico precoce e na terapêutica da maioria das doenças do aparelho respiratório. No caso da sibilância no lactente, a existência de um método efetivo, confiável e pouco invasivo de análise da inflamação nas vias aéreas seria de grande benefício para esses pacientes. Contudo, a forma como se pode avaliar a inflamação do aparelho respiratório ainda apresenta limitações. Todavia, vários métodos foram desenvolvidos e têm sido empregados em pesquisa e no atendimento assistencial de pacientes adultos e pediátricos com doenças respiratórias.

As vias aéreas inferiores, devido à sua configuração anatômica, exigem que o método seja invasivo para que se obtenham amostras diretas. Procedimentos invasivos apresentam indicações clínicas e de pesquisa muito específicas e exigem uma justificativa ética. Por isto, o desenvolvimento de técnicas menos invasivas para este tipo de análise e para monitorização da inflamação das vias aéreas é uma preocupação constante do profissional que trabalha nesta área. Considerando o grupo de lactentes, neste aspecto, são poucos os procedimentos que podem ser utilizados.

A biópsia pulmonar é, por razões éticas e práticas, indicada somente em doenças pulmonares graves (STEFANUTTI et al., 2000; DAVIES et al., 1997). O exame do escarro, apesar de ser um método bastante útil e amplamente utilizado em pesquisa, é limitado devido à dificuldade de obtenção de uma amostra adequada em crianças menores. Análises de sangue são amplamente utilizadas em pesquisa de resposta inflamatória em pacientes com doença respiratória, mas marcadores inflamatórios

sanguíneos parecem carecer de uma boa correlação com inflamação das vias aéreas e do pulmão (KOLLER, 2000; GAROFALO et al., 1994). Já o lavado bronco-alveolar é, atualmente, um procedimento clínico amplamente conhecido e utilizado em doenças respiratórias em crianças (DE BLIC et al., 1987; ROCK, 1995; SCHELLHASE et al., 1998), havendo ainda algumas restrições éticas na sua utilização em pesquisa de resposta inflamatória das vias aéreas nesses pacientes (SCHEINMANN et al., 1998). Portanto, em lactentes com BVA ou SR, sua indicação é ainda limitada.

Finalmente, a secreção nasofaríngea obtida através de aspirado nasofaríngeo (ANF) ou de lavado nasal é fácil e rápida de coletar. Vários estudos já foram publicados onde a secreção nasal foi empregada como método diagnóstico de inflamação do aparelho respiratório (NOAH et al., 1995 a, b; LIM et al., 1995; BENSON et al., 1997; VAN SCHAİK et al., 1999). Em lactentes com sibilância, este método tem sido muito utilizado para estudar a resposta imune (GAROFALO et al., 1992; EVERARD et al., 1994; SHEERAN et al., 1999; VAN SCHAİK et al., 1999). A correlação dos achados da análise da resposta inflamatória entre vias aéreas superiores e inferiores ainda não está clara. Porém, existem alguns estudos que demonstraram haver uma boa correlação entre esses dois locais. JOSHI et al. (1998), realizando ANF e aspirado traqueal simultâneos, e medindo os níveis de IL-2, em nove lactentes com BVA, encontraram uma correlação significativa entre vias aéreas superiores e inferiores. VAN SCHAİK et al. (1999) encontraram uma alta correlação ($r=0,972$, $p=0,003$) entre os níveis de INF- γ /IL-4 em ANF e aspirado traqueal de lactentes com sibilância induzida por IRV. Outros três estudos também descreveram resultados similares, correlacionando os níveis de IgE, exame citológico diferencial e subtipos de linfócitos e níveis de

interleucinas, em relação a secreção nasofaríngea e lavado brônquico ou aspirado traqueal, nesse grupo de pacientes (EVERARD et al., 1994; EVERARD et al., 1995; SHEERAN et al., 1999). Com esses resultados, o ANF tornou-se um dos métodos mais utilizados para se analisar a resposta inflamatória de pacientes com doença obstrutiva brônquica, induzida por IRV.

Como se pode observar, a análise do ANF, até o momento, parece ser a forma mais ética, fácil e promissora para o estudo da resposta inflamatória em lactentes com sibilância. É importante, contudo, que sejam consideradas as suas limitações, principalmente pelo fato de ser um método relativamente indireto de analisar a resposta inflamatória das vias aéreas inferiores.

2 Justificativa

A importância epidemiológica da sibilância no lactente transpõe fronteiras e raças. Sua prevalência e morbidade preocupam todos os profissionais que se deparam com esta situação clínica. Mesmo com as inúmeras publicações que procuram trazer um melhor entendimento da fisiopatogenia desta entidade clínica, seus mecanismos ainda permanecem pouco esclarecidos.

Parece claro, também, que a identificação dos diferentes grupos com doença obstrutiva brônquica, suas respostas imunes e fatores de risco são um grande passo para o diagnóstico, prevenção e tratamento da asma na criança maior. Sob o ponto de vista prognóstico, sabe-se que a maioria das crianças com sibilância nos primeiros anos de vida parece não ser o grupo que vai apresentar asma de característica atópica, no futuro. Da mesma forma, o fenótipo e o prognóstico de lactentes sibilantes deveriam ser determinados precocemente para que se possam realizar a prevenção e o tratamento efetivos, evitando complicações posteriores ou tratamentos desnecessários, como o remodelamento das vias aéreas e o uso indiscriminado de corticoterapia, respectivamente.

Com todas essas evidências e sob a luz do entendimento atual sobre a resposta imune desses lactentes, considera-se de potencial e justificado interesse estudar a resposta da IL-10 e as alterações citológicas (neutrófilos e eosinófilos), presentes nas vias aéreas de lactentes com sibilância, para que se possa analisar se existe alguma correlação dessas variáveis com os diferentes grupos de lactentes sibilantes ou com a gravidade do episódio de sibilância.

3 Objetivos

- *Principal*

- Determinar os níveis de IL-10 no aspirado nasofaríngeo de lactentes com infecção respiratória viral e sua associação com episódios de sibilância, comparando os níveis desta citocina, entre três grupos de pacientes (primeiro episódio de sibilância, sibilância recorrente e infecção de vias aéreas superiores).

- *Secundários*

- Determinar a composição celular no aspirado nasofaríngeo dos lactentes sibilantes estudados, especificamente com relação à presença de neutrófilos e eosinófilos.

- Verificar a correlação entre os níveis de IL-10, em secreção nasofaríngea, com gravidade dos episódios de sibilância.

- Descrever o método de obtenção de amostra de secreção nasofaríngea para análise de resposta inflamatória.

4 Casuística e Métodos

4.1 Seleção da Amostra

Foram recrutados para o estudo, lactentes menores de dois anos de idade que internaram no Princess Margaret Hospital for Children, da cidade de Perth, Austrália, no período de julho a setembro de 2000, época de inverno no hemisfério sul, com sintomas de infecção respiratória (coriza e tosse, associado ou não a febre), nos sete dias antecedentes. A seleção dos pacientes foi realizada a partir das solicitações diárias de exames de ANF para pesquisa de rotina de vírus respiratórios, requisitadas pela equipe médica responsável pelo paciente. Esses pacientes foram internados e avaliados inicialmente pelos médicos da Emergência do hospital, que desconheciam a inclusão ou não desses lactentes no estudo. Após admissão na enfermaria, o paciente era então selecionado, examinado e um questionário oral era aplicado aos pais. Todo o processo de seleção, a aplicação do questionário e a avaliação clínica foram realizados pelo investigador principal.

Os pacientes foram divididos nos seguintes grupos:

- a) Bronquiolite viral aguda: sibilância à ausculta respiratória e ausência de história de sibilância prévia (primeiro episódio de sibilância).
- b) Infecção de vias aéreas superiores: ausência de sibilância ou crepitações à ausculta pulmonar, ausência de dificuldade respiratória e saturação da hemoglobina $> 95\%$.
- c) Sibilância recorrente: sibilância à ausculta pulmonar e história de, no mínimo, um episódio de sibilância no passado, informado pelos pais.

Foram excluídos todos os casos com diagnósticos prévios de fibrose cística, cardiopatia congênita, imunodeficiências ou doença pulmonar crônica da prematuridade. Também foram excluídos todos os pacientes que estavam em uso de corticóide tópico ou sistêmico ou que apresentavam evidências clínico-radiológicas de pneumonia bacteriana. Não foram excluídos lactentes prematuros sem história de doença pulmonar prévia.

Setenta e sete pacientes preencheram os critérios de inclusão do estudo. Foram excluídos, após admissão no estudo, seis pacientes, pelos seguintes motivos: um paciente do grupo de BVA (material insuficiente), dois pacientes do grupo de IVAS (ausência de células no ANF e ANF com sangramento microscópico significativo) e três pacientes do grupo de SR (dois por preparo inadequado da amostra de ANF e um por diagnóstico de traqueomalacia durante internação). Portanto, foram finalmente incluídos no estudo 71 pacientes: 36 casos no grupo de BVA, 17 casos no grupo de IVAS e 18 casos no grupo de SR.

As características dos três grupos são apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos quando comparados em relação à história familiar de atopia e a presença de fumantes no domicílio. O grupo de SR apresentou idade maior do que os grupos de BVA e IVAS, com uma diferença estatisticamente significativa, com um $p < 0,001$ e $p = 0,027$, respectivamente (Teste de Mann-Whitney).

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas entre os grupos do estudo.

	BVA (n=36)	IVAS (n=17)	SR (n=18)
Idade, em meses, mediana, (interquartil)	3.0 (1,6-6,4)	3,6 (1,9-9,9)	8,5 (5,1-13,4)*
Sexo, % masculino	64	53	89
Peso, média, kg (DP)	6,2 (2,2)	6,9 (2,6)	9.2 (1.8)
Raça, % caucasiana	78	94	72
Imunofluorescência positiva para vírus, %	83	47	56
História familiar de atopia, %	58	65	67
Fumantes no domicílio, %	50	65	44
Hipoxemia, % **	28	0	5
Prematuridade, %	8	0	5

* p<0,001 e p=0,027, quando comparados aos grupos de BVA e IVAS, respectivamente (Teste de Mann-Whitney).

**Hipoxemia na sala de Emergência do hospital = sat <94

As causas principais de admissão hospitalar nos grupos de BVA, IVAS e SR foram, respectivamente: dificuldade respiratória (72%), recusa alimentar (67%) e dificuldade respiratória (89%). Os pacientes prematuros (idade gestacional inferior a 37 semanas) incluídos no estudo não apresentavam nenhuma história prévia de sintomas

respiratórios e nenhum fator adicional de risco para displasia broncopulmonar. A idade gestacional pediátrica dos prematuros era de: 31, 34, 35 e 36 semanas.

Não foi realizado radiograma de tórax em todos os pacientes. A solicitação desse exame ficou a critério da equipe clínica responsável, durante o período de internação do paciente. O radiograma de tórax foi realizado em 16/36 (44%) casos do grupo de BVA, 6/17 (35%) casos do grupo de IVAS e 10/18 (55%) casos do grupo de SR. Nos grupos de BVA e SR, não houve nenhum caso com evidência radiológica definida de pneumonia bacteriana ou de outras anormalidades que levassem a excluir o paciente do estudo. Os achados mais frequentes nestes dois grupos foram: infiltração peri-hilar (69%), hiperinsuflação pulmonar (54%) e atelectasia (23%). No grupo de IVAS, realizou-se radiograma de tórax em 6 casos. Dois casos sem anormalidade nenhuma, quatro casos com evidências de infiltração peri-hilar e um caso com hiperinsuflação pulmonar leve. A interpretação dos radiogramas de tórax foi realizada de rotina, em todos os casos, pelo grupo de radiologistas pediátricos do Princess Margaret Hospital for Children.

Nenhum paciente do estudo necessitou de ventilação mecânica.

4.2 Métodos

4.2.1 Questionário

Foi sempre aplicado aos pais (Anexo 1). Foram obtidas história clínica, história de exposição à fumaça de cigarro pelo lactente após o nascimento, história de prematuridade, assim como a história familiar de atopia. A história de sibilância prévia

era perguntada aos pais pelo investigador, buscando sempre esclarecer, da melhor forma possível, o conceito de sibilância (som contínuo, musical e de alta frequência, comparável a um assobio). A exposição à fumaça de cigarro era considerada positiva se pelo menos uma pessoa fumava no domicílio do paciente. A história familiar de atopia foi considerada positiva se pelo menos um dos pais ou irmão(s) apresentava algum tipo de doença atópica (asma, rinite alérgica ou eczema), diagnosticada por algum médico no passado.

4.2.2 Critério de gravidade

O único critério objetivo de gravidade, utilizado pelos autores, foi a medida de saturação da hemoglobina na sala de Emergência do hospital, quando o paciente era admitido. A oximetria de pulso apresenta uma boa correlação com gravidade em pacientes com BVA (MULHOLLAND et al., 1990). Outros critérios como frequência respiratória e escores clínicos demonstraram, segundo a literatura, não apresentar correlação significativa com hipoxemia e gravidade (MCMILLAN et al., 1988; MULHOLLAND et al., 1990; WANG et al., 1992). O valor da saturação da hemoglobina, através do oxímetro de pulso, foi anotado sempre retrospectivamente, a partir de registro no prontuário médico. Essa mensuração era realizada por enfermeiras treinadas da Emergência Pediátrica, que anotavam o valor mais constante durante um minuto. Foi considerado hipoxemia toda a oximetria de pulso com saturação da hemoglobina menor do que 94%, com o paciente em ar ambiente.

4.2.3 Exame físico

Era realizado um exame físico completo do aparelho respiratório pelo investigador principal. Sinais de dificuldade respiratória (taquipnéia, retrações torácicas, batimentos de asa do nariz, gemência e cianose) e ausculta pulmonar foram anotadas. Qualquer achado adicional pertinente ao exame físico era acrescentado à descrição.

4.2.4 Aspirado nasofaríngeo

Uma vez incluídos no estudo, todos os pacientes foram submetidos à realização de ANF. Este procedimento foi realizado sempre pelos técnicos do Serviço de Microbiologia do hospital, pessoal altamente qualificado para efetuá-lo, com experiência de vários anos. O ANF consistia em colocar o paciente em posição sentada, de frente para o técnico, com a ajuda de uma enfermeira ou de um dos pais, para uma adequada imobilização. A seguir, introduzia-se um cateter de polietileno, tamanho 8F (Indoplas Cat 452-08-007, Sydney, Austrália), por uma das narinas, até a nasofaringe (calculando, externamente, a distância entre o nariz e a orelha do paciente). Simultaneamente a retirada do cateter, aspirava-se continuamente, por 5-10 segundos. O material era coletado em um frasco especialmente designado para tal procedimento (Figura 2). Após obtenção da secreção, o cateter era lavado com 1 ml de solução salina tamponada (PBS) e esta amostra era adicionada ao frasco da coleta. Uma amostra adequada deveria apresentar um aspecto turvo, pela presença de células da nasofaringe. Após colheita da amostra, esta era transportada imediatamente para o laboratório, acondicionada em gelo, para processamento do material. Todo o paciente deveria ficar em jejum por, pelo menos, 30 minutos antes do ANF, pois a presença de leite na amostra de ANF poderia interferir

nos resultados da imunofluorescência para pesquisa de vírus. O ANF era realizado de rotina, nesta instituição, sempre nas primeiras 48h da admissão do paciente. A utilização desta técnica em pacientes sem nenhuma infecção respiratória é limitada pela escassez de secreção no ANF, motivo pelo qual não foi utilizado um grupo controle de crianças saudáveis.

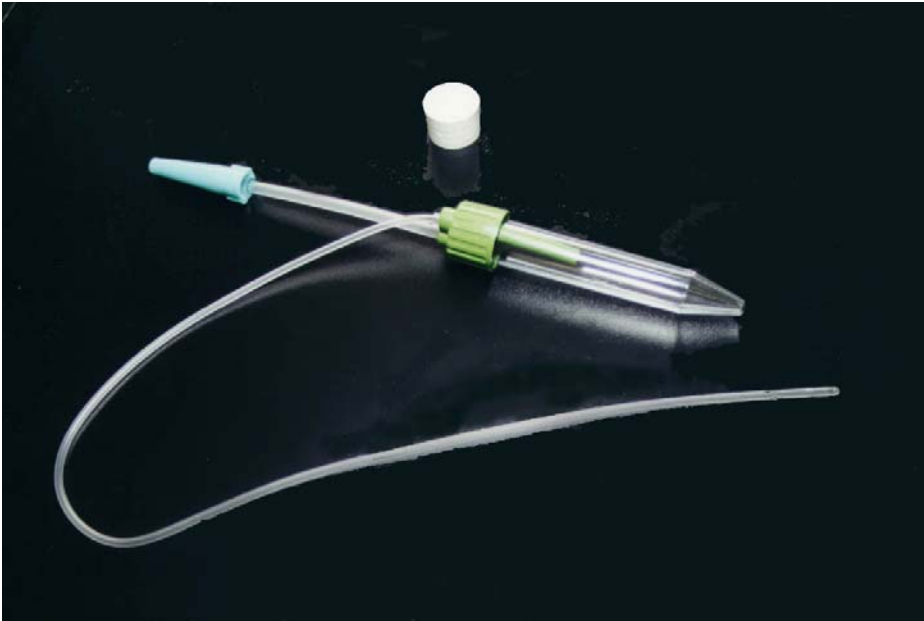


Figura 2 – Cateter de aspirado nasofaríngeo (Sydney, Austrália).

4.2.5 *Virologia*

Um volume de 0,5 ml do ANF era utilizado para realização de imunofluorescência direta, sendo colocada em um meio para transporte de vírus. Desta forma, seguindo as instruções dos fabricantes, foram testados, no laboratório de Microbiologia do Princess Margaret Hospital for Children, os seguintes vírus: VSR (Merifluor RSV, Meridian Diagnostics, UK), Parainfluenza tipo 1, 2 e 3 (Imagen, Dako Ltd, UK) Influenza tipo A e B (Imagen, DAKO Ltd, UK) e Adenovirus (Imagen, DAKO Ltd, UK). Testes de controle de qualidade são realizados semanalmente pelo laboratório

de microbiologia. A sensibilidade e especificidade da imunofluorescência direta, segundo os fabricantes, são, respectivamente: 98% e 92% para VSR, 98% e 97,5% para o grupo Parainfluenza, 96% e 100% para Influenza A, 87% e 99,5% para Influenza B e 86% e 100% para Adenovírus. Cultura de células para pesquisa de vírus foi realizada nas amostras com resultado de imunofluorescência direta negativas, a partir de células MRC5, Hep2, A549, LLC-MK, Vero, RD e McCoys.

4.2.6 Contagem total de células

Após separar material para virologia, o restante da amostra era enviado para o laboratório de Clinical Sciences do Telethon Institute of Child Health Research, para análise da citologia e dosagem das citocinas. Após pesagem da amostra, o material era centrifugado a 2.000 rpm, por 2 minutos. O sobrenadante era extraído e estocado em alíquotas de 100 µl, à -80°C, para dosagem de IL-10. O precipitado celular era então misturado com 1 ml de PBS. A contagem de células era realizada através da mistura de 10µl da mistura com 10 µl de corante Azul de Tripán, sob microscopia óptica, em Câmara de Neubauer (Laboratory Supplies, Poole, UK). As células viáveis aparecem não coradas ao microscópio, enquanto as células mortas ou em lise absorvem o corante e aparecem coradas em azul. A partir desta preparação, calculava-se a contagem total das células e a viabilidade celular em cada amostra. O número total de células foi apresentado multiplicado por 10⁶. A viabilidade foi descrita em percentagem de células viáveis.

4.2.7 Citologia diferencial

A partir da mistura do precipitado celular e do PBS, 50 μ l da amostra era colocada em citocentrífuga a 500 rpm, por 5 minutos. Após centrifugação, as lâminas eram coradas com corante de Leishman e as células identificadas, segundo a morfologia característica, e classificadas como: macrófagos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e células epiteliais. Os tipos de células eram descritos em percentagem, após contagem de 200 células sob microscopia óptica, com aumento de 100X. A coloração de Leishman diferencia claramente eosinófilos de neutrófilos. Os grânulos dos eosinófilos coram-se de cor vermelho brilhante, comparado ao róseo do neutrófilo (Figura 3), permitindo uma adequada diferenciação entre esses dois tipos de células. O processamento da amostra, contagem total das células e exame de citologia diferencial era realizado pelo investigador principal.

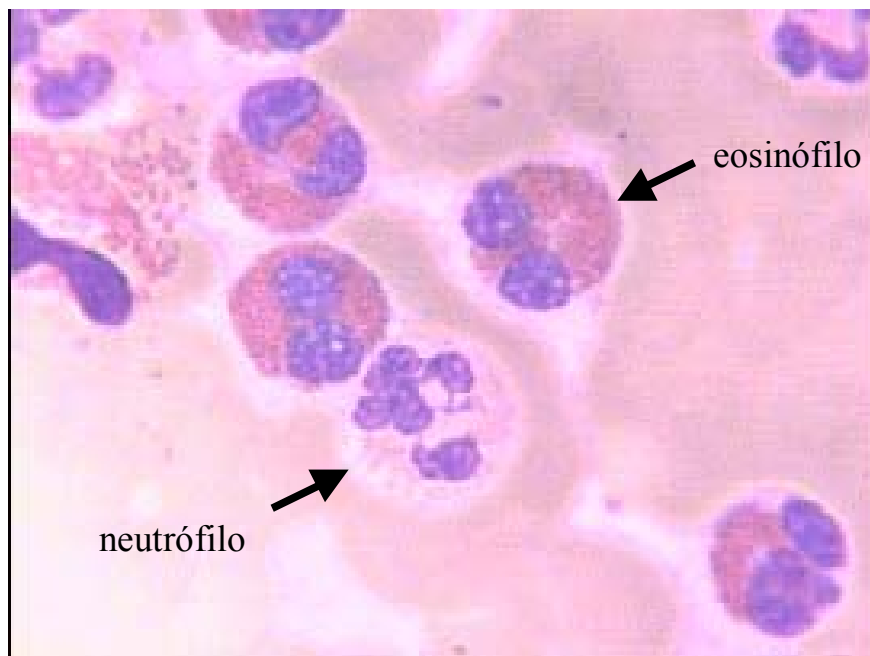


Figura 3 – Diferença entre neutrófilo e eosinófilo pela coloração de Leishman (100X). Foto: líquido pleural, HCPA.

4.2.8 *Mensuração de IL-10*

A IL-10 (Pharmigen, USA) foi dosada pelo método de ELISA, segundo instruções do fabricante, pela técnica responsável pelas dosagens de citocinas, no laboratório de Clinical Sciences do Telethon Institute of Child Health Research. O limite inferior de detecção de IL-10 deste método era de 20pg/ml. Quando o nível de uma determinada amostra era indetectável, metade do limite inferior de detecção foi considerado para análise estatística. O valor da citocina medida foi ajustado sempre para o peso da amostra coletada.

Uma das vantagens da técnica de ANF é que todas as amostras são testadas com a diluição previamente conhecida. Isto torna o cálculo da concentração de solutos (citocinas) mais fidedignos. A concentração final de cada citocina foi expresso como a concentração da citocina medida sobre o volume de secreção nasofaríngea coletada. Este método de ANF permite o cálculo da concentração do soluto mais próximo do “verdadeiro”, por medir os solutos baseados especificamente no volume de amostra coletada. Por outro lado, a diluição dos solutos em um lavado nasal é de difícil determinação, pois a diluição da amostra não é conhecida. O uso de marcadores endógenos (albumina) ou exógenos (inulina), em lavado nasal, apresenta limitações importantes quando utilizado em pacientes com inflamação da mucosa do epitélio respiratório, como em infecções virais (FRISCHER & BARALDI, 2000). Por essas constatações, o ANF foi o método escolhido para a análise de IL-10 no presente estudo.

4.2.9 Seguimento dos pacientes

Todos os casos foram acompanhados pelo investigador principal até a alta hospitalar, para assegurar-se de que fossem incluídas todas as informações sobre a evolução dos pacientes, durante o período de internação.

4.3 Análise estatística

O pacote estatístico Sigmastat foi utilizado para realização da análise estatística deste estudo. Para análise demográfica entre os grupos, foram utilizados teste de qui-quadrado e teste exato de Fischer para variáveis qualitativas, e teste de Mann-Whitney para variáveis quantitativas. Para análise da citologia e citocinas no ANF entre os grupos, foram utilizados os testes t, de Mann-Whitney e ANOVA. Na realização de cálculos de correlações entre variáveis foi utilizado o teste de Correlação de Pearson. A amostra foi estimada em 60 pacientes (20 pacientes em cada um dos três grupos), para um $p < 0,05$.

4.4 Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Princess Margaret Hospital for Children. Os pais foram sempre informados de todos os detalhes da pesquisa e assinaram um documento (Anexo 2), confirmando o conhecimento dos mesmos e consentindo com a participação no estudo. Nenhum dos pais abordados pelo investigador recusou participar do estudo.

5 Resultados

5.1 Níveis de IL-10:

Houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de IL-10 nas amostras de ANF, entre o grupo de BVA e o grupo de IVAS (mediana: 0,019 ng/ml vs. 0,006 ng/ml; $p=0,017$) (Figura 5). Além disto, o teste ANOVA, realizado entre os três grupos para comparação de níveis de IL-10 no ANF, confirmou a diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$) entre os grupos de BVA e IVAS. O grupo de SR não apresentou diferença estatisticamente significativa dos níveis de IL-10 em relação aos outros dois grupos. Uma amostra do grupo de SR foi excluída porque não houve volume da amostra suficiente para a mensuração de IL-10.

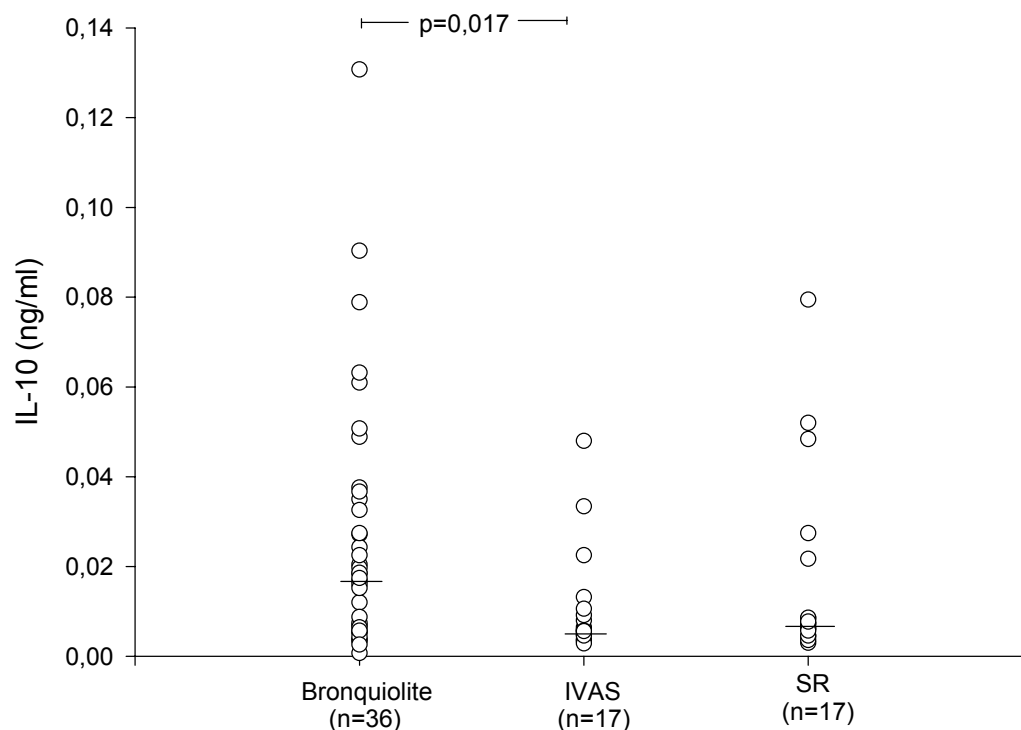


Figura 4: Comparação das medianas das concentrações de IL-10 no ANF, entre os grupos estudados. Teste de Mann-Whitney.

5.2 Correlação ou diferença dos níveis de IL-10 no aspirado nasofaríngeo com outras variáveis do estudo:

Não houve nenhuma correlação ou diferença entre os níveis de IL-10 no ANF e gravidade (hipoxemia), história familiar de atopia e tabagismo domiciliar, quando analisados os dois grupos com sibilância. As concentrações de IL-10 no ANF não apresentaram nenhuma correlação significativa com a idade nos pacientes estudados, quando analisados em grupos separados ou como uma amostra única.

5.3 Exame citológico do aspirado nasofaríngeo:

Em relação ao exame citológico do ANF, encontrou-se uma predominância de neutrófilos em todos os grupos, como ilustrado pela foto do ANF de um dos pacientes do estudo que apresentava bronquiolite viral aguda (Figura 5).

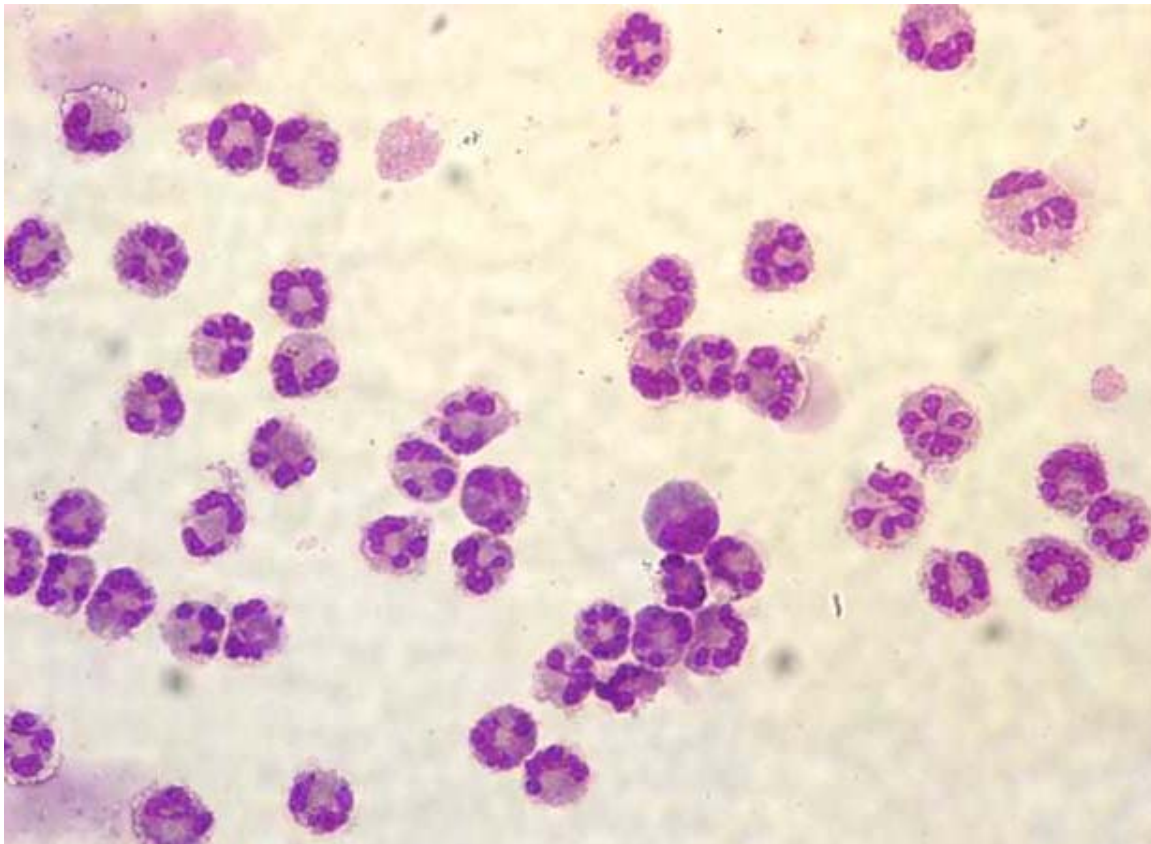


Figura 5: Exame citológico com predominância de neutrófilos no ANF de um lactente com bronquiolite viral aguda (40X, coloração de Leishman).

Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao exame citológico diferencial entre os grupos, como pode ser observado na Tabela 2. Foram excluídas desta análise, cinco amostras (dois casos do grupo de BVA, um caso do

grupo de IVAS e dois casos do grupo de SR) devido à dificuldade de análise da citologia diferencial, por problemas de preparação das lâminas.

Não foram encontrados eosinófilos no ANF de nenhum paciente do estudo, exceto em um caso do grupo de SR, cujo percentual daquelas células foi de somente 1% do total da contagem.

Tabela 2: Contagem total de células e citologia diferencial do ANF entre os grupos

	BVA (n=34)	IVAS (n=16)	SR (n=16)	Valor do p
Neutrófilos, mediana, % (interquartil)	87 (68-92)	89 (58-92)	84 (63-96)	NS
Eosinófilos, %	0	0	0	-
Macrófagos, mediana, % (interquartil)	11 (7-18)	10 (6-23)	15 (4-30)	NS
Células epiteliais %	0	0 (0-0,5)	0	-
Linfócitos %	0 (0-5)	0,5 (0-1)	0,5 (0-3)	-
Viabilidade, mediana, % (interquartil)	91 (87-94)	91 (89-95)	94 (91-96)	NS

- NS: não significativo

O grupo de SR apresentou uma contagem total de células (mediana: 4,3 e interquartil: 2,1-6,1) significativamente maior ($p=0,03$) do que o grupo de BVA (mediana: 2,0 e interquartil: 0,7-3,6) (Figura 6). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação a contagem total de células entre os outros grupos.

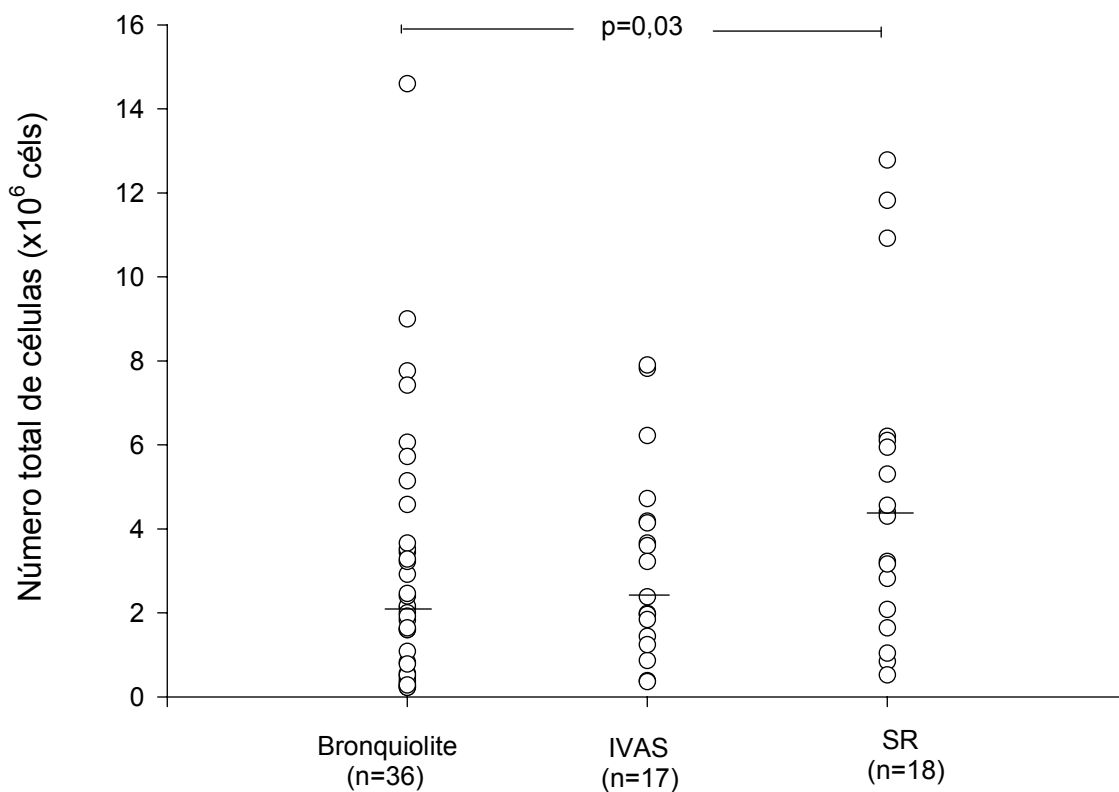


Figura 6 - Comparação das medianas do número total de células em ANF, entre os grupos estudados. Teste de Mann-Whitney.

5.4 Virologia:

O VSR foi o agente etiológico mais freqüentemente encontrado no ANF, em todos os grupos. Em relação as imunofluorescências positivas, o VSR foi identificado em 28 (93%) casos no grupo de BVA, 6 (67%) casos no grupo de IVAS e 9 casos (90%) no grupo de SR. Não houve nenhum caso de falso negativo em relação à imunofluorescência, quando comparado à cultura de vírus.

5.5 Método do aspirado nasofaríngeo

O ANF foi realizado em 77 pacientes, sem nenhuma complicação. Considerando os 71 pacientes incluídos no estudo, em um caso do grupo de SR não houve quantidade de amostra suficiente para a dosagem de IL-10 e em cinco amostras não foi possível realizar o exame de citologia diferencial. Portanto, a colheita e processamento da amostra para realização de dosagem de IL-10 foram realizados com sucesso em 70/71 (99%) casos. As amostras demonstraram uma adequada qualidade para realização de exame citológico diferencial em 66/71 (93%) casos. Cada amostra coletada com sucesso permitiu a obtenção de uma média de quatro alíquotas de 100 µl de sobrenadante, quantidade suficiente para mensuração de pelo menos quatro marcadores inflamatórios pelo método de ELISA. A média da viabilidade celular das amostras foi superior a 90% nos três grupos.

6 Discussão

No presente estudo, a concentração de IL-10 mostrou-se significativamente aumentada na secreção nasofaríngea de lactentes com primeiro episódio de sibilância, quando comparada com a de lactentes com IVAS. Foi encontrado também um predomínio absoluto de neutrófilos em secreção nasofaríngea nos três grupos (primeiro episódio de sibilância, SR e IVAS). Além disto, não foram encontrados eosinófilos nestas amostras, exceto em um paciente com sibilância recorrente. Mesmo assim, tal paciente apresentava somente 1% de eosinófilos no ANF.

O motivo pelo qual somente alguns lactentes apresentam sibilância secundária a infecções respiratórias virais ainda permanece obscuro. As principais hipóteses suscitadas pela literatura são: via aérea de menor calibre, alterações da resposta imune e/ou do controle neural (STEIN & MARTINEZ, 1999; FOLKERTS et al., 1998). Suas respectivas importâncias ainda não têm clara comprovação científica. Algumas dessas hipóteses já foram bem estudadas e outras ainda se encontram em fase de investigação. Esses mecanismos não são excludentes em um mesmo paciente, podendo estar associados.

A possibilidade de alguns indivíduos nascerem com uma alteração da resposta imune, que possa exacerbar uma resposta inflamatória a infecções respiratórias virais, ainda permanece no terreno especulativo. Contudo, BLANCO-QUIRÓS et al. (1999) demonstraram que crianças que desenvolveram BVA apresentavam baixos níveis de IL-12 (citocina com potente efeito Th1) ao nascimento e altos níveis de IL-12 e IL-10, no sangue, durante o episódio agudo de sibilância. Além disto, parece haver uma associação de determinados polimorfismos de IL-10 com doença respiratória.

Polimorfismos que se caracterizam por diminuída ou elevada produção de IL-10 parecem estar associados com asma grave no adulto ou sibilância recorrente na criança de origem não atópica, respectivamente (LIM et al., 1998; BALDINI & MARTINEZ, 2001). Além disto, JOHN et al. (1998) demonstraram que macrófagos alveolares de pacientes com asma produzem menos IL-10, quando comparados aos de pacientes voluntários não asmáticos. No presente estudo, lactentes com sibilância (primeiro episódio) produziram mais IL-10 no ANF do que pacientes com IVAS (sem doença de vias aéreas inferiores). Com esses achados, pode-se admitir a hipótese de que alguns lactentes sejam portadores de uma “predisposição genética” para uma exacerbada e específica resposta inflamatória a infecções respiratórias virais, predispondo à DOB não associada a atopia, nesta faixa etária.

A predominância de neutrófilos na secreção nasofaríngea, nos três grupos analisados, detectada neste estudo, sugere que esta célula deve desempenhar um papel importante nas infecções respiratórias virais. Este achado assemelha-se aos resultados já descritos em outros estudos (EVERARD et al., 1994; SHEERAN et al., 1999). Não houve diferença estatisticamente significativa no exame citológico diferencial do ANF, quanto ao tipo de célula e sua distribuição percentual, entre os três grupos do presente estudo. Não foram realizados ANF em crianças saudáveis (sem IRV) como controle, pela natural dificuldade de obtenção de secreção nasal através deste método. Contudo, alguns estudos, através de lavado nasal, demonstraram que crianças sem IRV não apresentam predominância de neutrófilos em secreção respiratória (NOAH et al, 1995a; MARGUET et al., 2000). Com estes resultados, pode-se inferir que a resposta neutrofílica das vias aéreas, em crianças com IRV, poderia contribuir ativamente para o processo de obstrução

brônquica. Pode-se então admitir que os pacientes que internam com quadro de sibilância secundária à IRV, nos primeiros dois anos de vida, parecem representar o extremo de um espectro de gravidade da infecção viral do aparelho respiratório no qual um ou mais fatores, ainda não conhecidos, poderiam estar facilitando a disseminação da infecção para as vias aéreas inferiores.

Em relação à produção de IL-10, nos casos estudados, encontrou-se um aumento significativo desta citocina, na secreção nasofaríngea de lactentes com primeiro episódio de sibilância, quando comparada ao grupo de IVAS. Estudos anteriores que analisaram a produção de IL-10 na secreção nasal, nesse grupo de pacientes, encontraram resultados opostos. SHEERAN et al. (1999) demonstraram que a IL-10 está aumentada em lactentes com infecção por VSR, quando comparados a um grupo de crianças saudáveis. Foi encontrado também um aumento significativo dos níveis de IL-10 na fase de convalescença, quando comparada com a fase aguda, em um estudo realizado em lactentes com bronquiolite por VSR, através da resposta de cultura de monócitos em sangue periférico. Além disto, a produção elevada nestes pacientes demonstrou uma correlação com sibilância recorrente posterior (BONT et al., 2000). Por outro lado, VAN SCHAİK et al. (1999), em um estudo com delineamento semelhante ao atual, não encontraram diferença significativa nos níveis de IL-10 no ANF, entre grupos de lactentes com sibilância, IVAS e um grupo controle. Apesar dos resultados do estudo de VAN SCHAİK et al. (1999), se considerarmos que realmente existem diferenças na produção de IL-10 entre os grupos de sibilância e controles (IVAS e saudáveis), como foi encontrado no presente estudo e nos estudos anteriormente citados (SHEERAN et al., 1999; BONT et al., 2000), pode-se especular que um aumento de IL-10 diminuiria a

resposta imune nas vias aéreas, no início da infecção, permitindo sua disseminação para as vias aéreas inferiores. Atualmente, já se sabe que a IL-10 parece alterar algumas funções de defesa dos neutrófilos, diminuindo sua capacidade funcional (CASSATELA, 1998). Considerando que o neutrófilo é o tipo de célula predominante nas vias aéreas desses lactentes, poderíamos inferir que uma produção aumentada de IL-10, em algumas dessas crianças, através da diminuição da atividade funcional dos neutrófilos em vias aéreas superiores, pode contribuir para a ocorrência de DOB, devido à disseminação da infecção para as vias aéreas inferiores. Ao contrário desta hipótese, não foi encontrada diferença nos níveis de IL-10 no ANF entre os grupos de SR e IVAS no presente estudo. Uma explicação provável para este achado seria que a produção “exacerbada” de IL-10 poderia reduzir-se ou desaparecer com a idade, considerando a diferença de idade entre esses grupos (Tabela 1). Toda a criança nasce com um padrão de resposta imune Th2 que está presente na vida intrauterina (HOLT et al., 1999). O desenvolvimento de doença atópica parece ser causado por um atraso na “maturação” do sistema imune, no que diz respeito a um desvio para resposta tipo Th1, com uma posterior permanência de uma predominância do padrão de resposta imune Th2 (HOLT et al., 1992; PRESCOTT et al., 1998; PRESCOTT et al., 1999). Por isto, como a IL-10 é uma citocina com características funcionais predominantes de resposta Th2 (aquela relacionada à produção de IgE e aumento da proliferação e função de eosinófilos), “estímulos Th1” (infecções e desenvolvimento da flora intestinal), constantes nos primeiros anos de vida, poderiam diminuir tal resposta com o passar dos anos. Por isto, esta hipótese explicaria porque, além do crescimento da via aérea, a maioria dos lactentes com sibilância sem caráter atópico, deixam de apresentar sintomas de obstrução brônquica aos 4-6 anos de vida. Em

resumo, uma produção intrínseca inicial aumentada de IL-10 poderia predispor à sibilância secundária à IRV em lactentes, a qual diminuiria ou desapareceria com o tempo, devido ao desvio natural de resposta imune linfocitária para o padrão Th1, secundária a estímulos naturais. Além disto, esta resposta “exagerada” da IL-10 não estaria diretamente relacionada a um caráter genético atópico.

A ausência de eosinófilos na secreção nasofaríngea neste estudo, somando-se às evidências da literatura (EVERARD et al., 1994; SHEERAN et al., 1999; MARGUET et al., 2000), coloca em dúvida a hipótese de que a sibilância secundária a infecções respiratórias virais do lactente possa ter um caráter de resposta eosinofílica, do tipo alérgico (Th2). Em doenças definitivamente alérgicas, pacientes apresentam eosinófilos em lavado nasal e em lavado bronco-alveolar (NOAH et al., 1995b; MARGUET et al., 2000). STEVENSON et al. (1997) demonstraram que crianças menores de cinco anos de idade, somente com sibilância e IRV, não apresentam eosinófilos no lavado bronco-alveolar, ao contrário de crianças com asma e atopia. Outra evidência, que também enfraquece esta hipótese, é a de que os episódios de sibilância da maioria dos lactentes tendem a se tornar menos freqüentes e menos graves com o passar dos anos (HENDERSON et al., 1979), o que não aconteceria se houvesse um padrão atópico. Com estas informações, resta uma pergunta relevante em relação à origem da produção elevada de PCE nos estudos que analisaram tal proteína, em lactentes com BVA (GAROFALO et al., 1992, GAROFALO et al., 1994; INGRAM et al., 1995; REIJONEM et al., 1997). Em um artigo de revisão, Gleich afirma que amostras originadas de lesões ricas em neutrófilos podem apresentar níveis elevados de PCE (GLEICH, 2000). Esta afirmação origina-se de um estudo no qual foi analisada a

presença de PCE em neutrófilos maduros, através de imunofluorescência indireta e radioimunoensaio (SUR et al., 1998). Com este achado, pode-se concluir que a idéia de que a PCE seja um marcador específico de inflamação associada ao eosinófilo, deve ser interpretada com cuidado. Assim, todos os estudos que encontraram níveis elevados de PCE em crianças com BVA podem estar simplesmente refletindo o grau de resposta neutrofílica aguda que se encontra nesses pacientes, pois nenhum estudo documentou uma presença mínima de eosinófilos nas vias aéreas de lactentes com sibilância.

No presente estudo, não foi encontrada nenhuma correlação entre níveis de IL-10 no ANF e a gravidade dos episódios de sibilância. A ausência de tal achado poderia estar relacionada com a peculiaridade da amostra estudada, na qual os dois grupos com sibilância não apresentavam característica marcada de gravidade. O número de pacientes que apresentava hipoxemia durante a admissão nos grupos de BVA (28%) e SR (5%) não predominava nesta amostra e nenhum paciente necessitou de ventilação mecânica. Portanto, a ausência de pacientes gravemente hipoxêmicos ou em ventilação mecânica torna mais difícil a análise dos fatores de risco de gravidade, neste tipo de estudo.

O aumento no número total de células no ANF de pacientes do grupo de SR, superior ao do grupo de BVA, deste estudo, poderia significar uma maior maturidade do sistema imune ou uma resposta inflamatória mais intensa devida à recorrência da DOB no primeiro grupo. Pelo fato deste achado ser de caráter inespecífico, fica limitada a capacidade de interpretação deste resultado. Contudo, a hipótese de uma progressiva redução da produção de IL-10, secundária a infecções respiratórias virais, em pacientes

com DOB, poderia explicar esta aumentada quantidade de células nas vias aéreas das crianças com sibilância recorrente.

A técnica de ANF utilizada neste estudo demonstrou ser um procedimento simples e apresentou um bom rendimento. Ocorreram poucas perdas relacionadas a dificuldades técnicas do método. Além disto, o alto percentual de viabilidade das amostras demonstra que esta técnica pode ser seguramente utilizada para análise da inflamação (dosagem de citocinas, cultura de células etc.) das vias aéreas. Quanto à identificação de vírus no ANF, o método apresentou um índice de positividade adequado, revelando que a amostra do estudo parece ser representativa em relação à população de lactentes com DOB secundária a IRV. Portanto, o método do aspirado nasofaríngeo, apresentado neste estudo, demonstra ser uma forma útil e simples de colheita de material para analisar marcadores inflamatórios nas vias aéreas, para esses tipos de delineamentos.

Em relação ao tipo de resposta celular na via aérea, uma análise de marcadores mais específicos do que a PCE para atividade de eosinófilos, tal como a proteína básica principal, na secreção nasofaríngea de lactentes com sibilância secundária a infecção respiratória viral, pode auxiliar no esclarecimento do papel desta célula na fisiopatogenia desses pacientes.

Concluindo, as infecções respiratórias virais apresentam um caráter inflamatório predominantemente neutrofílico na fase aguda. Além disto, o desenvolvimento de DOB, em lactentes, apresenta mais de um fator causal, incluindo a resposta inflamatória. Contudo, parece que alguns lactentes são predispostos a DOB, por apresentarem uma resposta imune alterada, sem excluir a possível associação com outros fatores, como calibre menor da via aérea. A IL-10, por sua vez, poderia ser uma das

principais citocinas responsáveis pela gênese da DOB nos primeiros meses de vida, devido à sua produção elevada nesses pacientes, especialmente nesta fase do desenvolvimento da resposta imune. Esta função ou atividade poderia diminuir com o passar do tempo devido a estímulos Th1, naqueles pacientes sem predisposição genética para atopia. Estudos longitudinais, com repetidas análises da resposta da IL-10 nesses pacientes, são necessários para um maior esclarecimento desta hipótese.

7 Conclusões

1. Foram encontrados níveis de IL-10 significativamente aumentados no aspirado nasofaríngeo de pacientes com primeiro episódio de sibilância, quando comparados com lactentes com infecções de vias aéreas superiores.
2. Os neutrófilos foram as células predominantes no exame citológico do aspirado nasofaríngeo de lactentes com doença obstrutiva brônquica associados a infecções respiratória virais.
3. Na quase totalidade dos casos, não foram identificados eosinófilos no exame citológico do aspirado nasofaríngeo de lactentes com sibilância secundária a infecções respiratória virais.
4. Não foi encontrada correlação entre níveis de IL-10 em aspirado nasofaríngeo e gravidade do episódio de sibilância em lactentes com infecções respiratórias virais.
5. O aspirado nasofaríngeo demonstrou ser um procedimento simples, seguro e com bom rendimento para colheita de amostras para análise citológica e de marcadores inflamatórios em lactentes.

8 Referências Bibliográficas

1. Aherne W, Bird T, Court SDM, Gardner PS, McQuillin J. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* 1970;23:7-18.
2. Arnold R, Werner F, Humbert B, Werchau H, König W. Effect of respiratory syncytial virus-antibody complexes on cytokine (IL-8, IL-6, TNF- α) release and respiratory burst in human granulocytes. *Immunology* 1994;82:184-91.
3. Baldini M, Martinez FD. IL-10 promoter polymorphisms and the risk of wheezing after RSV bronchiolitis in children [abstract]. *International Meeting of the American Thoracic Society* 2001;A57.
4. Beasley R, Roche WR, Roberst JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:806-17.
5. Benson M, Strannegard I, Wennergren G, Strannegard O. Cytokines in nasal fluids from school children with seasonal allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:143-9.
6. Blanco-Quirós A, González H, Arranz E, Lapeña S. Decreased interleukin-12 levels in umbilical cord blood in children who developed acute bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:175-80.
7. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, Aalderen WMC, Brus F, Draaisma JTM, et al. Monocyte IL-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in a one-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1518-23.
8. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990;323:1033-9.
9. Cassatela MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1-beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993;178:2207-11.
10. Cassatela MA. The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *Int J Clin Lab Res* 1998;28:148-61.

11. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;54:825-57.
12. David JR, Vadas MA, Butterworth AE, Brito PA, Carvalho EM, David RA, et al. Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patients with eosinophilia. *N Engl J Med* 1980;303:1147-52.
13. Davies L, Dolgin S, Kattan M. Morbidity and mortality of open lung biopsy in children. *Pediatrics* 1997;99:660-4.
14. de Blic J, McKelvie P, Le Bourgeois M, Blanche S, Benoist MR, Scheinmann P. Value of bronchoalveolar lavage in the management of severe acute pneumonia and interstitial pneumonitis in the immunocompromised child. *Thorax* 1987;42:759-65.
15. De Monchy JGR, Kauffman HF, Koetter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, Vries K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:373-6.
16. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996;125:191-6.
17. Dubois DB, Ray CG. Viral infections of the lower respiratory tract. In: Taussig LM & Landau LI, editors. *Pediatric Respiratory Medicine*. 1st ed. Mosby; 1999. p. 572-9.
18. Ehlenfield DR, Cameron K, Welliver RC. Eosinophilia at the time of respiratory syncytial virus bronchiolitis predicts childhood reactive airway disease. *Pediatrics* 2000;105:79-83.
19. Everard ML, Swarbrick A, Wrightam M, McIntyre J, Dunkley C, James PD, et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child* 1994;71:428-32.
20. Everard ML, Fox G, Walls AF, Quint D, Fifield R, Walters C, et al. Tryptase and IgE concentrations in the respiratory tract of infants with acute bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1995;72:64-9.
21. Everard ML. Acute bronchiolitis and pneumonia in infancy resulting from the respiratory syncytial virus. In: Taussig LM & Landau LI, editors. *Pediatric Respiratory Medicine*. 1st ed. Mosby; 1999. p. 580-95.

22. Faden HF, Kaul TJ, Ogra PL. Activation of oxidative and arachidonic acid metabolism in neutrophils by respiratory syncytial virus antibody complexes: possible role in disease. *J Infect Dis* 1983;148:110-6.
23. Faden H, Ogra P. Neutrophils and antiviral defense. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:86-92.
24. Falloon J, Gallin JI. Neutrophil granules in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:653-62.
25. Folkerts G, Busse WW, Nijkamp FP, Sorkness R, Gern J. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1708-20.
26. Frigas E, Loegering DA, Solley GO, Farrow GM, Gleich GJ. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc* 1981;56:345-53.
27. Frischer T, Baraldi E. Upper airway sampling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162 Suppl 2:28-30.
28. Garofalo R, Kimpen JLL, Welliver RC, Ogra PL. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1992;120:28-32.
29. Garofalo R, Dorris A, Ahlstedt S, Welliver RC. Peripheral blood eosinophil counts and eosinophil cationic protein content of respiratory secretions in bronchiolitis: relationship to severity of disease. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:111-7.
30. Gibson PG, Manning PJ, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Dolovich J, Denburg JA, et al. Allergen-induced asthmatic responses – relationship between increases in airway responsiveness and increases in circulating eosinophils, basophils, and their progenitors. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:331-5.
31. Giugno KM. Concentrações de interleucina-2 (IL-2) na secreção nasofaríngea de crianças acometidas de bronquiolite viral aguda pelo vírus sincicial respiratório [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
32. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:651-63.
33. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *AJDC* 1986;140:543-6.

34. Hall CB, Kopelman AE, Douglas Jr. RG, Geiman JM, Meagher MP. Neonatal respiratory syncytial virus infection. *N Engl J Med* 1979;300:393-6.
35. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1991;163:693-8.
36. Henderson FW, Collier AM, Clyde Jr WA, Denny FW. Respiratory syncytial virus infections, reinfections and immunity – A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 1979;300:530-4.
37. Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Rose AH, Robinson BWS, et al. Genetic “risk” for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy* 1992;22:1093-9.
38. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; 402 Suppl 1:12-7.
39. Faden HS, Kaul TN, Lin T, Ogra PL. Activation and mucosal migration of polymorphonuclear leukocytes (PMN) during respiratory syncytial virus (RSV) infection [abstract]. *Pediatr Res* 1984;18:A274.
40. Ingram JM, Rakes GP, Hoover GE, Platts-Mills TAE, Heymann PW. Eosinophil cationic protein in serum and nasal washes from wheezing infants and children. *J Pediatr* 1995;127:558-64.
41. Janeway CA, Travers P, Hunt S, Walport M. Host defense against infection. In: Janeway CA & Travers P, editors. *Immuno biology – The immune system in health and disease*. 3rd ed. Garland Publishing Inc.; 1997a. p. 9:1-9:52.
42. Janeway CA, Travers P, Hunt S, Walport M. Allergy and hypersensitivity. In: Janeway CA & Travers P, editors. *Immuno biology – The immune system in health and disease*. 3rd ed. Garland Publishing Inc., 1997b. p. 11-1:11-25.
43. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Robichaud A, O’Connor B, et al. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1 α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon- γ release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:256-62.
44. Joshi P, Kakakios A, Jayasekera J, Issacs D. A comparison of IL-2 levels in nasopharyngeal and endotracheal aspirates of babies with respiratory syncytial viral bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:618-20.

45. Kaul TN, Faden HS, Middleton E, Fugitani T, Ogra PL. Release of pharmacological mediators from human neutrophils by viral immune complexes: effects on clinical disease [abstract]. *Pediatr Res* 1982;16:A224.
46. Kimpen JLL. Respiratory syncytial virus immunology. *Pediatr Allergy Immunol* 1996;7 Suppl 9:86-90.
47. Koller DY. Sampling methods – urine/blood analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162 Suppl 2:31-3.
48. Larsen GL, Holt PG. The concept of airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162 Suppl 2:2-6.
49. Lehmann AK, Halstensen A, Sornes S, Rokke O, Waage A. High levels of interleukin-10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect Immun* 1995;63:2109-12.
50. Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ. Antibacterial properties of eosinophil major protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol* 1989;142:4428-34.
51. Lim MC, Taylor RM, Naclerio RM. The histology of allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:136-44.
52. Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 1998;352:113.
53. Marguet C, Dean TP, Warner JO. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and interferon-gamma in bronchoalveolar lavage fluid from children with airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1016-22.
54. Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N Engl J Med* 1988;319:1112-7.
55. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.
56. Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Halonen M. Differential immune responses to acute lower respiratory illness in early life and subsequent development of persistent wheezing and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:915-20.

57. McMillan JA, Tristram DA, Weiner LB, Higgins AP, Sandstrom C, Brandon R. Prediction of the duration of hospitalization in patients with respiratory syncytial virus infection: use of clinical parameters. *Pediatrics* 1988;81:22-6.
58. Medzhitov R, Janeway C. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-44.
59. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
60. Motojima S, Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:801-05.
61. Mulholland EK, Olinski A, Shann FA. Clinical findings and severity of acute bronchiolitis. *Lancet* 1990;335:1259-61.
62. Naclerio RM, Proud D, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Hendley JO, Sorrentino J, et al. Kinins are generated during experimental rhinovirus colds. *J Infect Dis* 1988;157:133-42.
63. Noah TL, Henderson FW, Wortman IA, Devlin RB, Handy J, Koren HS, et al. Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *J Infect Dis* 1995a;171:584-92.
64. Noah TL, Henderson FW, Henry MM, Peden DB, Devlin RB. Nasal lavage cytokines in normal, allergic, and asthmatic school-age children. *Am J Respir Crit Care* 1995b;152:1290-6.
65. Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998;27:1497-507.
66. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117:1162-72.
67. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998;160:4730-7.
68. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999;353:196-200.

69. Reijonen TM, Korppi M, Kleemola M, Savolainen K, Kuikka L, Monomen I, et al. Nasopharyngeal eosinophil cationic protein in bronchiolitis: relation to viral findings and subsequent wheezing. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:35-41.
70. Rock MJ. The diagnostic utility of bronchoalveolar lavage in immunocompetent children with unexplained infiltrates on chest radiograph. *Pediatrics* 1995;95:373-7.
71. Román M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Simon V, Escobar AM, et al. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:190-5.
72. Scheinmann P, Pedersen S, Warner JO, de Blic J. Methods for assessment of airways inflammation: paediatrics. *Eur Respir J* 1998; 11 Suppl 26:53-8.
73. Schellhase DE, Fawcett DD, Schutze GE, Lensing SY, Tryka AF. Clinical utility of flexible bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in young children with recurrent wheezing. *J Pediatr* 1998;132:312-8.
74. Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisher K, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:115-21.
75. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F. Eosinophil cationic protein in nasal secretion and in serum and myeloperoxidases in serum in respiratory syncytial virus bronchiolitis: relation to asthma and atopy. *Acta Paediatr* 1994;83:1151-5.
76. Sigurs N, Bjarnason R, Fridrik S, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1501-7.
77. Stefanutti D, Morais L, Fournet, Jan D, Casanova J, Scheinmann P, et al. Value of open lung biopsy in immunocompromised children. *J Pediatr* 2000;137:165-71.
78. Stein RT, Sherill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-5.
79. Stein RT, Martinez FD. Mechanisms of disease in childhood asthma. In: Taussig LM & Landau LI, editors. *Pediatric Respiratory Medicine*. 1st ed. Mosby; 1999. p. 918-34.

80. Stevenson EC, Turner G, Heany LG, Schock BC, Taylor R, Gallagher T, et al. Bronchoalveolar lavage findings suggest two different forms of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1027-35.
81. Sur S, Glitz DG, Kita H, Kujawa SM, Peterson EA, Weiler DA, et al. Localization of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in neutrophilic leukocytes. *J Leukoc Biol* 1998;63:715-22.
82. Turner RB. The role of neutrophils in the pathogenesis of rhinovirus infections. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:832-5.
83. van Shaik SM, Tristram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver II RC, Welliver RC. Increased production of INF- γ and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:630-6.
84. van Schaik SM, Welliver RC, Kimpen JLL. Novel pathways in the pathogenesis of respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Pulmonol* 2000;30:131-8.
85. Wang EE, Milner RA, Navas L, Maj H. Observer agreement for respiratory signs and oximetry in infants hospitalized with lower respiratory infections. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:106-9.
86. Wardlaw A, Dunnette L, Gleish G, Collins J, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:62-9.
87. Welliver RC. Chemokines, cytokines, and inflammatory cells in respiratory syncytial virus infection: similarities to allergic responses. *Pediatr Asthma Allergy Immunol* 2000;14:93-100.
88. Westendorp RGJ, Langermans JAM, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:170-3.
89. Wilson NM, Phagoo SB, Silverman M. Atopy, bronchial responsiveness, and symptoms in wheezy 3 year olds. *Arch Dis Child* 1992;67:491-5.
90. Winther B, Brofeldt S, Christensen B, Mygind N. Light and scanning electron microscopy of nasal biopsy material from patients with naturally acquired common colds. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984;97:309-18.

91. Young JDE, Peterson CGB, Venge P, Cohn ZA. Mechanisms of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 1986;321:613-6.
92. Young S, O’Keeffe PT, Smott J, Landau LI. Lung function, airway responsiveness, and respiratory symptoms before and after bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1995;72:16-24.
93. Young S, Arnott J, O’Keeffe PT, Le Souef PN, Landau LI. The association between early life lung function and wheezing during the first 2 yrs of life. *Eur Respir J* 2000;15:151-57.
94. Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D, Dumarey C, Huerre M, Vargaftig BB, et al. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest* 1995;95:2644-51.

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Information sheet - parents

This letter is to tell you about a research study on acute bronchiolitis being conducted in the Department of Respiratory Medicine at Princess Margaret Hospital.

Characteristic features of bronchiolitis are the acute symptoms of runny nose, cough, wheeze and respiratory distress. The respiratory viruses are the most common cause. Most infants with acute bronchiolitis are not very sick, but a small number are ill enough to require hospitalization. Despite the frequency and importance of acute bronchiolitis, a number of controversies still surround the knowledge of the disease. The inflammation that is a characteristic of the disease is not well understood. In addition, it is not known what differentiates the patients who recover completely from bronchiolitis from the ones who go on to develop asthma afterwards. A large number of studies have been published attempting to clarify the inflammatory process and the outcome of the infants with bronchiolitis. Therefore, it is now apparent that patients with bronchiolitis may have different immune responses and different risk factors. Unfortunately, little is known about the nature of the immune response and its relation to the outcome in bronchiolitis.

The methods for assessing and monitoring lung inflammation are still being developed. Most of these studies have used bronchoscopy with bronchoalveolar lavage as the method of assessment for inflammatory changes. Bronchoalveolar lavage has demonstrated to be very useful for clinical and research purposes in asthma, immunodeficiencies, interstitial lung diseases and cystic fibrosis. However, although considered a safe procedure, it is an invasive method. Therefore, it would be very useful to find a less invasive procedure for assessing and monitoring inflammation in respiratory diseases in these children.

Nasopharyngeal aspirate might be a very promising way of measuring inflammation in this group of patients, considering that it is easy to collect and could represent a way of monitoring inflammation. It is a procedure that has a potential role in research in respiratory disease. It is now recognized that nasopharyngeal aspirate is a sensitive method for detecting viral respiratory infection and causes minor discomfort with no significant adverse effects for young children.

Researchers internationally and here at the Department of Respiratory Medicine are beginning to understand how this inflammation can occur, but we still need to learn a lot more. This study is designed to help us learn more about the inflammation in bronchiolitis. It will look at inflammation in nasopharyngeal aspirate and how the inflammation can affect the acute disease and its outcome. Your participation in this study will not involve any additional visit to the hospital.

Study: “Nasopharyngeal Aspirate as a Method for Assessment of Inflammatory Markers in Acute Bronchiolitis”

As part of this study we will be collecting nasopharyngeal aspirate. Nasopharyngeal aspirate is now routinely taken from infants with bronchiolitis as part of their normal clinical assessment for viral identification. It is easy to collect and could represent an important way of monitoring inflammation. We will collect the nasopharyngeal aspirate in the first 24 hours after your child is admitted. The nasopharyngeal secretions are obtained by placing a polyethylene catheter into the nasopharynx, followed by aspiration into a mucous trap. With your consent, we will use this fluid to make a comparison of inflammatory markers in infants with bronchiolitis and healthy children. Since the nasopharyngeal aspirate is routinely taken, the study will not involve any extra trauma or discomfort for your child. But this procedure will provide information about inflammation and its relation with severity and risk factors for recurrent wheeze and asthma. All results will be confidential.

We have designed this study so that it can be done during the time your child is at the hospital. Your child is free to participate in the study. If you change your mind, or don't want to participate, you can do so, and it will not affect your child's treatment in any way. Please feel free to ask any questions you want. It is important that you understand what we are doing.

Thank you for taking the time to read this letter. If you have any questions that are not answered immediately you can call (a) Dr. Paulo Pitrez or (b) Dr. Peter Sly, on 9340 8222.

FORM OF CONSENT

UMR number:.....

I, _____, have read and understood the information explaining the study titled “Nasal Wash as a Method for Assessment of Inflammatory Markers in Acute Bronchiolitis”.

Any questions asked have been answered to my satisfaction.

I understand that my child may withdraw from the study at any stage and withdrawal will not interfere with access to routine care.

I agree that the research data generated from the results of this study may be published, provided that names are not used.

I agree to allow my son/ daughter to participate in this study.

(full name of participant to signatory)

Signed: _____ (parent) Date: _____
_____ (participant) Date: _____

I, _____, have explained the above study to the signatory
(Investigators full name) above who states that he/she understands the same.

Signed..... Date

ANEXO 3

VALORES DE IL-10 NO ANF

Casos	Grupo	IL-10 (ng/ml)
1	1	0,018
2	1	0,048
3	1	0,016
4	1	0,05
5	1	0,005
6	1	0,035
7	1	0,032
8	1	0,016
9	1	0,006
10	1	0,020
11	1	0,09
12	1	0,019
13	3	0,048
14	2	0,033
15	3	0,004
16	1	0,012
17	1	0,003
18	1	0,037
19	1	0,015
20	1	0,018
21	1	0,011

22	1	0,008
23	1	0,027
24	3	0,003
25	3	0,008
26	1	0,060
27	3	0,027
28	3	0,007
29	1	0,003
30	2	0,013
31	1	0,005
32	3	0,003
33	1	0,130
34	1	0,017
35	2	0,003
36	1	0,024
37	2	0,004
38	1	0,004
39	2	0,003
40	1	0,007
41	1	0,063
42	3	0,007
43	1	0,006
44	3	0,079
45	1	0,036
46	1	0,005
47	2	0,006
48	2	0,002

49	2	0,005
50	3	0,005
51	2	0,008
52	1	0,002
53	3	0,004
54	1	0,005
55	2	0,005
56	3	0,052
57	2	0,004
58	3	0,006
59	2	0,009
60	3	0,008
61	2	0,022
62	1	0,022
63	3	0,006
64	2	0,005
65	3	0,005
66	1	0,078
67	1	0,027
68	2	0,048
69	3	0,021
70	2	0,01
71	3	0,007