

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JÉSSICA GONÇALVES

**CONFIABILIDADE DA COLORAÇÃO HEMATOLÓGICA
RÁPIDA PARA CITOLOGIA DO ESCARRO INDUZIDO**

FLORIANÓPOLIS
2013

Jéssica Gonçalves

**CONFIABILIDADE DA COLORAÇÃO HEMATOLÓGICA
RÁPIDA PARA CITOLOGIA DO ESCARRO INDUZIDO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Emílio Pizzichini
Co-Orientadora: Prof. Dra.
Márcia Margaret Menezes Pizzichini

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gonçalves, Jéssica
CONFIABILIDADE DA COLORAÇÃO HEMATOLÓGICA RÁPIDA PARA
CITOLOGIA DO ESCARRO INDUZIDO / Jéssica Gonçalves ;
orientador, Emilio Pizzichini ; co-orientadora, Márcia
Margaret Menezes Pizzichini. - Florianópolis, SC, 2013.
84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. escarro induzido. 3. coloração.
4. May-Grünwald-Giemsá. 5. corante panótico. I. Pizzichini,
Emílio. II. Pizzichini, Márcia Margaret Menezes. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas. IV. Título.

Jéssica Gonçalves

CONFIABILIDADE DA COLORAÇÃO HEMATOLÓGICA RÁPIDA PARA CITOLOGIA DO ESCARRO INDUZIDO

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências Médicas” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 9 de outubro de 2013.

Prof.^a Dr.^a Tânia Silvia Fröde
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Emílio Pizzichini
Orientador

Prof. Dr. Roger Walz
Membro

Prof. Dr. Marcelino O. Vieira
Membro

Prof.^a Dr.^a Leila J. M. Steidle
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida e pelas experiências que Ele me proporciona a cada dia;

À minha família: meus amados pais Rogério e Jane, e meus queridos irmãos Francisco e Francine, por sempre me apoiarem e incentivarem, e pela fé na minha capacidade de vencer qualquer obstáculo, sempre me guiando com o coração aberto;

Ao meu marido e grande amor Fernando, pelo carinho e companheirismo em todos os momentos, especialmente aqueles mais difíceis de ultrapassar;

Aos meus queridos orientadores, Dr. Emílio e Dra. Márcia Pizzichini, pela dedicação e disposição em me ajudar sempre, apesar de todos os contratempos encontrados no caminho;

Aos amigos e colegas pesquisadores do NUPAIVA, D. Célia, Cristiane, Fernanda, Andrea, Maíra, Dra. Leila e Dr. Marcelino, pelo grande apoio em todos os momentos de estudo;

À amiga bioquímica Samira Cardoso Ferreira, pela grande colaboração, sem a qual este trabalho não seria possível;

À todos os colegas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e do Serviço de Análises Clínicas do HU, especialmente aos amigos Adriana, Vera, Franciele, Jean, Ângela, Marilei, Marlene, Wisnard, Sara, Marien, Prof. Cláudia, Prof. Luíza, Renata, Ana, Pâmela, Dra. Joanita e muitos outros colegas que compartilharam comigo esta conquista;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, em especial à Prof. Tânia Fröde pelo auxílio e o Prof. Roger Walz pela colaboração no aperfeiçoamento do trabalho;

Aos colegas de mestrado, amigos que ficarão para a vida;

À todos os meus queridos amigos, que sempre me acompanharam de perto, cuidando pra que não perdesse o rumo;

Aos voluntários participantes do estudo, que possibilitaram este trabalho;

À todos que de uma forma ou de outra me ajudaram neste caminho.

“Não chores porque já terminou, sorria porque aconteceu.”
Gabriel García Márquez

RESUMO

Introdução: A análise do escarro induzido é importante na avaliação de condições inflamatórias das vias aéreas nas duas principais doenças respiratórias obstrutivas: asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Devido à heterogeneidade das características clínicas e funcionais destas doenças, existe a necessidade de determinar o fenótipo clínico do paciente, para otimizar o seu manejo, especialmente nos casos mais graves. Contudo, o uso do escarro induzido na prática clínica ainda é restrito em virtude da metodologia envolvida na indução e processamento do escarro. **Objetivos:** determinar a confiabilidade da coloração hematológica rápida para a análise do escarro induzido, visando a diminuição do tempo e custo do processamento das amostras. **Métodos:** estudo transversal que compara a técnica de coloração May-Grünwald-Giemsa (considerada padrão) com a coloração hematológica rápida (corante Panótico Rápido). Participaram do estudo 50 indivíduos, sendo 21 portadores de asma, 19 portadores de DPOC e 10 indivíduos hígidos sem sintomas respiratórios. Após indução do escarro, foram geradas quatro citospinas, sendo duas coradas pela coloração padrão e duas pela coloração de estudo. As citospinas foram lidas independentemente por duas bioquímicas treinadas para leitura de escarro, estando as lâminas codificadas, impedindo a identificação dos respectivos pares de citospinas ou acesso a resultados anteriores. A confiabilidade do método foi avaliada pela concordância entre observadores e intra-observador para as contagens celulares resultantes dos dois métodos de coloração através do Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) e a concordância da identificação de escarro neutrofílico e eosinofílico entre observadores e entre as duas colorações foi calculada através do Kappa estatístico. **Resultados:** O CCI apontou concordância quase perfeita entre os observadores para as contagens celulares de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para a coloração May-Grünwald-Giemsa e para a coloração hematológica rápida (CCI = 0,81-1,0). A concordância para as contagens de linfócitos entre observadores foi substancial para o corante May-Grünwald-Giemsa (CCI=0,76) e quase perfeita para a coloração hematológica rápida (CCI=0,83). O CCI mostrou uma concordância intra-observador quase perfeita para neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Para as contagens de linfócitos, o CCI apontou concordância substancial para um os dois observadores (CCI= 0,65 e 0,75). A concordância entre observadores na identificação de escarro eosinofílico e neutrofílico em citospinas coradas pelos dois

métodos do estudo foi de substancial a quase perfeita ($\kappa = 0,75 - 1,0$). A concordância intra-observador, embora considerada substancial, foi inferior do que aquela entre observadores. **Conclusão:** A coloração hematológica rápida pode ser considerada alternativa confiável para o processamento das amostras de escarro induzido.

Palavras-chave: escarro induzido, coloração, May-Grünwald-Giemsa e corante panótico.

ABSTRACT

Introduction: Induced sputum analysis is an important tool to access inflammatory conditions of the airways in the main obstructive respiratory diseases: asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The heterogeneity of functional and clinical characteristics in these diseases shows the need to determine the clinical phenotype for better clinical management, particularly in the more severe cases. However, the use of induced sputum in clinical practice is restricted, due to the complex methods involved in sputum induction and processing.

Objectives: to determine the reliability of the use of a rapid hematologic stain in the analysis of induced sputum, in attempt to reduce the time and costs of sample processing.

Methods: cross-sectional study to compare May-Grünwald-Giemsa staining (considered standard) to rapid hematologic staining (Diff-Quick). Fifty subjects were included in the study, 21 asthmatics, 19 patients with COPD and 10 healthy individuals without respiratory symptoms. After sputum induction, four slides were generated, two of them stained with May-Grünwald-Giemsa and the other two stained with rapid hematologic stain. The cytopspins were independently counted by two biochemists qualified to sputum examination. The slides were coded preventing the identification of the respective pairs of slides or previous results. The reliability of the method was evaluated through intra-observer and inter-observer agreement between the cell counts obtained from the two staining methods, using the Intraclass Correlation Coefficient (ICC), and the agreement identifying neutrophilic or eosinophilic sputum was evaluated through kappa statistic.

Results: ICCs indicated an almost perfect agreement between observers for the cell counts of neutrophils, eosinophils and macrophages for both staining techniques (ICC = 0,81 – 1,0). The agreement between lymphocytes counts was substantial for May-Grünwald-Giemsa stain (ICC = 0,76) and almost perfect for the rapid hematologic stain (ICC = 0,83). Intra-observer agreement was almost perfect for neutrophils, eosinophils and macrophages counts. For lymphocyte counts the coefficient showed substantial agreement for both observers (ICC = 0,65 - 0,75). The agreement in identification of eosinophilic or neutrophilic sputum was from substantial to almost perfect (kappa = 0,75 – 1,0). Although the intra-observer agreement was substantial, inter-observer agreement was higher.

Conclusion: the rapid hematologic stain is reliable and can be considered suitable for sputum examination.

Key-words: induced sputum, staining, May-Grünwald-Giemsa, Diff-Quick.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Citospinas de escarro induzido coradas pela coloração de May-Grünwald-Giemsa.	42
Figura 2. Citospinas de escarro induzido coradas pela coloração hematológica rápida.	43
Figura 3. Celularidade diferencial no escarro induzido dos três grupos do estudo.	47
Figura 4. Contagem celular diferencial (mediana) em citospinas coradas com May-Grünwald-Giemsa (em verde) e pela coloração hematológica rápida (em azul).	48
Figura 5. Reprodutibilidade entre observadores dos percentuais de neutrófilos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).	50
Figura 6. Reprodutibilidade entre observadores dos percentuais de eosinófilos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).	51
Figura 7. - Reprodutibilidade entre observadores dos percentuais de macrófagos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).	52
Figura 8. Reprodutibilidade intra-observador na contagem diferencial dos neutrófilos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa e pelo método hematológico rápido, mostrado como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).	53
Figura 9. Reprodutibilidade intra-observador na contagem diferencial dos eosinófilos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa e pelo método hematológico rápido, mostrado como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).	54
Figura 10. Reprodutibilidade intra-observador na contagem diferencial dos macrófagos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa e pelo método hematológico rápido, mostrado como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coloração celular e de suas estruturas de acordo com o método de coloração.....	27
Tabela 2. Valores normais para citologia de escarro em adultos.....	28
Tabela 3. Valores obtidos na citologia de escarro em crianças saudáveis	28
Tabela 4. Valores para citologia de escarro em adultos saudáveis em Florianópolis.....	29
Tabela 5. Características demográficas, clínicas e funcionais dos participantes*.....	45
Tabela 6. Contagem celular total (CCT) e diferencial do escarro induzido*	46
Tabela 7. Concordância entre observadores na contagem celular diferencial* do escarro induzido em citospinas coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa.....	49
Tabela 8. Concordância entre observadores na contagem celular diferencial* do escarro induzido em citospinas coradas pelo método da coloração hematológica rápida.....	49
Tabela 9. Concordância intra-observador entre as contagens celulares realizadas em citospinas coradas por May-Grüwald-Giemsa e pela coloração hematológica rápida.....	53
Tabela 10. Concordância entre observadores para identificação de escarro eosinofílico e neutrofílico na avaliação de lâminas coradas pelos dois métodos do estudo.	56
Tabela 11. Concordância intra-observador para identificação de escarro eosinofílico e neutrofílico na avaliação de lâminas coradas pelos dois métodos do estudo.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACQ	Questionário de controle de asma
BD	Broncodilatador
CCI	Coefficiente de Correlação Intraclasse
CCT	Contagem celular total
CI_s	Corticóides inalatórios
CVF	Capacidade vital forçada
D-PBS	Solução salina tamponada em fosfato de Dulbecco
DP	Desvio-Padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DTT	Dithiothreitol
ECP	Proteína eosinofílica catiônica
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRVA	Hiperresponsividade das vias aéreas
HU	Hospital Universitário
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon gama
MBP	<i>Major basic protein</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> for Windows
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th	Linfócitos auxiliares
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEF₁	Volume Expirado Forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DAS DOENÇAS DAS VIAS AÉREAS.....	22
1.2	EXAME DO ESCARRO PARA ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS	22
1.3	HISTÓRICO DO EXAME DO ESCARRO PARA AVALIAR A INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS	23
1.4	CITOLOGIA DO ESCARRO INDUZIDO	26
1.5	VALORES NORMAIS DA CELULARIDADE DO ESCARRO..	27
1.6	UTILIDADE DO EXAME DO ESCARRO	29
1.7	JUSTIFICATIVA	30
2	HIPÓTESES	33
2.1	HIPÓTESE NULA: $H_0: P \neq P_0$	33
2.2	HIPÓTESE ALTERNATIVA: $H_1: P = P_0$	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MÉTODOS	37
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	37
4.2	LOCAL DO ESTUDO	37
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	37
4.4	TAMANHO DA AMOSTRA	37
4.5	PARTICIPANTES	38
4.5.1	Critérios de inclusão	38
4.5.2	Critérios de Exclusão:	39
4.6	PROCEDIMENTOS DO ESTUDO.....	40

4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS	45
5.1	CELULARIDADE TOTAL E DIFERENCIAL DO ESCARRO INDUZIDO	46
5.2	CONCORDÂNCIA ENTRE OBSERVADORES NA AFERIÇÃO DA CITOLOGIA DIFERENCIAL.....	48
5.3	CONCORDÂNCIA DA CITOLOGIA DIFERENCIAL INTRA-OBSERVADOR.....	52
5.4	CONCORDÂNCIA ENTRE OBSERVADORES E INTRA-OBSERVADOR NA IDENTIFICAÇÃO DE ESCARRO EOSINOFÍLICO E NEUTROFÍLICO	55
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	71
	APÊNDICE II – Elegibilidade Asma	75
	APÊNDICE III – Elegibilidade DPOC.....	77
	APÊNDICE IV – Elegibilidade Controle	79
	ANEXO I – Certificado Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	81
	ANEXO II – Questionário De Controle De Asma – Acq7.....	83

1 INTRODUÇÃO

A compreensão dos mecanismos das doenças e o diagnóstico correto são geralmente facilitados pela análise de tecidos, fluídos e secreções produzidos espontaneamente pelo organismo. A análise de fluídos corporais, tais como urina, sangue e líquor têm sido largamente utilizadas em diversas áreas da medicina. Porém, até recentemente, a análise do escarro para compreender os mecanismos das doenças respiratórias havia sido abandonada por ser considerada pouco confiável e pouco reprodutível (DJUKANOVIC E STERK, 2004).

Atualmente, existe um corpo considerável de evidências demonstrando que a inflamação das vias aéreas é central na patogênese das doenças das vias aéreas. Além disso, a inflamação das vias aéreas é considerada responsável pelos sintomas, obstrução ao fluxo de ar das vias aéreas, exacerbações e alterações estruturais secundárias (PIZZICHINI *et al.*, 1997). Por isso, a inflamação destas vias tem um papel extremamente significativo nas duas principais doenças respiratórias obstrutivas: asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (SILVA E HETZEL, 2001).

Na asma, a inflamação das vias aéreas é uma reação de hipersensibilidade, mediada por linfócitos auxiliares 2 (Th2) (WHO, 2012). Nesse tipo de resposta predominam eosinófilos e mediadores inflamatórios tais como interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5, IL-13). A resposta inflamatória da asma é responsável pelos sintomas, hiperresponsividade das vias aéreas (HRVA) e/ou desenvolvimento de limitação crônica ao fluxo de ar das vias aéreas, com perda progressiva da função pulmonar (HARGREAVE E PARAMESWARAN, 2006). Na DPOC a inflamação caracteristicamente envolve uma resposta mediada por linfócitos Th1 (WHO, 2013). Nesse tipo de resposta predominam neutrófilos e mediadores inflamatórios tais como interferon gama (INF- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e IL-8. Esse tipo de inflamação é considerado responsável por alterações estruturais das vias aéreas e do parênquima pulmonar, e pela perda acelerada da função pulmonar na DPOC.

No entanto, tanto na asma como na DPOC existe grande heterogeneidade nas características clínicas e inflamatórias, que resultam em diferentes fenótipos clínicos (PAVORD *et al.*, 2002). Portanto, existe a necessidade de caracterizar o fenótipo do paciente para otimizar seu manejo, particularmente nos casos mais graves (PAVORD *et al.*, 1999; PAVORD *et al.*, 2002; JAYARAM *et al.*, 2006).

Além disso, a inflamação das vias aéreas pode ser determinada ou piorada pela exposição aos seguintes agentes: alérgenos inalatórios, produtos químicos utilizados no trabalho, tabagismo, além de infecções virais e bacterianas. Essas diferentes exposições resultam em diferentes tipos de respostas inflamatórias, as quais, por sua vez, respondem de maneira distinta aos medicamentos (PIZZICHINI *et al.*, 1997; HARGREAVE E PARAMESWARAN, 2006). Esses fatos sustentam a importância da investigação das inflamações das vias aéreas, através da análise do escarro induzido.

1.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DAS DOENÇAS DAS VIAS AÉREAS

As hipóteses diagnósticas das doenças respiratórias são baseadas geralmente na coleta de dados (história da doença e suas manifestações), exame clínico e exame radiológico. Com relação às doenças das vias aéreas os testes diagnósticos são predominantemente funcionais, incluindo a espirometria, teste de broncoprovocação e pletismografia. O estudo da inflamação das vias aéreas, apesar de não ser diagnóstico, fornece informações relevantes à fenotipagem da doença e ao seu manejo medicamentoso (HALDAR E PAVORD, 2007). Contudo, seu uso na prática clínica é ainda muito restrito em virtude da metodologia envolvida na indução e processamento do escarro.

1.2 EXAME DO ESCARRO PARA ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

A avaliação da inflamação das vias aéreas nas doenças respiratórias não é recente (BROWN, 1958; OPPENHEIMER *et al.*, 1967; CHODOSH, 1970), mas apenas nos últimos 30 anos é que ganhou credibilidade nos meios científicos. A partir dos anos 80, quando foram realizadas as primeiras tentativas de estudar a patogênese das doenças das vias aéreas por meio da broncoscopia (biópsia e lavado broncoalveolar) (SILVA, 2001) é que a inflamação das vias aéreas passou a ser considerada como central na patogênese de doenças como asma e DPOC. Apesar de útil para a elucidação dos mecanismos da asma e DPOC, a broncoscopia ficou limitada aos centros de pesquisa devido a sua natureza invasiva (DJUKANOVIC E STERK, 2004). Outras limitações dos estudos da inflamação das vias aéreas envolvendo broncoscopia incluem a dificuldade de obter medidas repetidas, a impossibilidade de realizar o exame durante exacerbações e custos do procedimento.

Atualmente existem técnicas não invasivas que medem a inflamação das vias aéreas, incluindo o óxido nítrico do ar exalado (SMITH *et al.*, 2005), sobrenadante do ar exalado (KHARITONOV E BARNES, 2002), temperatura do ar exalado (MELO, POPOV E SOLE, 2010), conteúdo bioquímico da secreção mucosa (ALAM *et al.*, 1992) e a análise de escarro induzido (PIZZICHINI *et al.*, 1997). Dos exames acima, presentemente apenas o escarro induzido é considerado confiável, reprodutível, discriminativo de diferentes tipos de inflamação e responsivo às intervenções. Por isso, o escarro induzido tem sido considerado um instrumento importante no manejo das doenças inflamatórias das vias aéreas (PALOMBINI *et al.*, 2001). Além disso, a indução do escarro é uma técnica segura e pouco invasiva (PIZZICHINI *et al.*, 2002), e é reprodutível, permitindo identificar o tipo de inflamação e sua intensidade (PIN *et al.*, 1992; PAVORD *et al.*, 1997).

1.3 HISTÓRICO DO EXAME DO ESCARRO PARA AVALIAR A INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

O exame do escarro espontâneo como marcador de responsividade ao tratamento com corticoides orais nas vias aéreas foi primeiramente estudado por Brown em 1958 (BROWN, 1958). No entanto, por ser considerado um exame de baixa reprodutibilidade foi abandonado progressivamente. O interesse em seu emprego reapareceu a partir de 1989 com os trabalhos de Gibson e cols. (GIBSON *et al.*, 1989). Esses autores, utilizando esfregaços de escarro espontâneo (selecionado da saliva) foram capazes de determinar o perfil celular encontrado no escarro de asmáticos com e sem exacerbação, e em tabagistas com diagnóstico de bronquite crônica. A partir deste estudo o exame do escarro foi reintroduzido em pesquisa como uma forma não invasiva de estudar os mecanismos da inflamação das vias aéreas. Naquele estudo, de Gibson e cols. (GIBSON *et al.*, 1989) examinaram o primeiro escarro espontâneo produzido pela manhã. Os resultados mostraram o predomínio de eosinófilos e células metacromáticas (mastócitos e basófilos) no escarro dos indivíduos com asma. Além disso, foi demonstrado a reprodutibilidade dos resultados.

Em virtude da dificuldade de muitos asmáticos produzirem escarro espontaneamente, em 1992, Pin e cols. (PIN *et al.*, 1992) desenvolveram uma técnica de obtenção do escarro através de indução, adaptando a técnica utilizada para o diagnóstico de infecção por *Pneumocystis carinii* em pacientes infectados pelo vírus HIV (LEIGH *et al.*, 1989). O estudo inicial destes autores com o escarro induzido

demonstrou que o escarro podia ser obtido com sucesso em indivíduos incapazes de produzi-lo espontaneamente e que as amostras obtidas eram capazes de diferenciar indivíduos normais de asmáticos.

Posteriormente, foram realizadas diversas pesquisas para o refinamento do método de análise de escarro. Foi padronizada a técnica de seleção do escarro, que visa minimizar a contaminação por conteúdo salivar (PIZZICHINI *et al.*, 1996). Essa técnica forneceu amostras com menor quantidade de células escamosas (fator de confundimento), contagens celulares totais mais elevadas e maior número de células viáveis não-escamosas. Todos estes fatores resultaram em melhor qualidade das lâminas utilizadas para a realização das contagens celulares, sem que suas proporções fossem alteradas significativamente, além de não afetar as características do processo inflamatório presente nas vias aéreas.

Na mesma época, um estudo comparou amostras de escarro induzido e espontâneo obtidas de um mesmo indivíduo (PIZZICHINI *et al.*, 1996), concluindo que a análise das duas secreções fornecia resultados similares para o conteúdo celular. Além disso, a amostra de escarro induzido, quando separada da saliva, continha maior proporção de células viáveis e menor contaminação por células epiteliais salivares, o que era vantajoso por proporcionar melhores condições de análise das amostras.

Fatores que poderiam influenciar o sucesso do procedimento da indução de escarro e as contagens celulares foram estudados em três trabalhos publicados em 1995 por Popov e cols. (POPOV *et al.*, 1995). Foi demonstrado que a indução do escarro é mais eficaz quando realizada utilizando uma solução salina hipertônica (de 3-5%) ao invés de solução salina isotônica (0,9%). Entretanto, o desconforto para o paciente é maior com a solução salina hipertônica. O uso de nebulizadores ultrassônicos mostrou-se mais efetivo na produção de escarro do que nebulizadores a jato, sendo que o índice de sucesso na obtenção de escarro foi de 9% com o nebulizador a jato e de 60% com o nebulizador ultrassônico. O desconforto para o paciente foi proporcional ao débito (mL/min) do nebulizador, sendo maior quanto maior o débito. Outro fator analisado foi o uso de salbutamol no pré-tratamento da indução para prevenir possível broncoconstrição causada pelas soluções salinas isotônica e hipertônica. O uso de broncodilatador pré-indução do escarro, além de efetivamente prevenir a broncoconstrição, não influenciou a celularidade do escarro induzido (POPOV *et al.*, 1995). Estudos posteriores, demonstraram que o índice de sucesso na indução do escarro, usando nebulizadores ultrassônicos e solução salina

hipertônica em doses crescentes (3 a 5%) pode ser $\geq 85\%$ em indivíduos que não conseguem produzir escarro espontaneamente (VERAS *et al.*, 2011; CHABOILLEZ *et al.*, 2013).

Em 1996, Pizzichini e cols. (PIZZICHINI *et al.*, 1996) estudaram a validade e reprodutibilidade da celularidade e da medida de marcadores da inflamação na fase líquida do escarro induzido. O estudo avaliou além das citologias total e específica do escarro, as concentrações de ECP (proteína eosinofílica catiônica), MBP (*major basic protein*), EDN (neurotoxina derivada do eosinófilo), albumina, fibrinogênio, triptase e IL-5. A indução e análise do escarro foram realizadas em duas oportunidades (em um período de seis dias) e o estudo avaliou 39 indivíduos (10 saudáveis, 19 asmáticos e 10 fumantes). A análise dos resultados dos diferentes dias comprovou alta reprodutibilidade para as contagens de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e células metacromáticas. Entretanto, os resultados mostraram menor reprodutibilidade para as contagens celulares totais e de linfócitos. Em relação aos mediadores da fase fluída, houve alta reprodutibilidade para o ECP, MBP, EDN, albumina e fibrinogênio, e menor reprodutibilidade em diferentes dias para a triptase. A pesquisa mostrou que houve um aumento na proporção de eosinófilos, células metacromáticas, triptase, ECP, MBP e EDN nas amostras dos indivíduos asmáticos quando comparados com o restante dos participantes do estudo. As proporções de neutrófilos, albumina e fibrinogênio foram semelhantes em asmáticos e fumantes com bronquite. Houve uma correlação altamente significativa entre a proporção de eosinófilos e as concentrações de ECP, MBP e EDN. A quantidade de células metacromáticas e concentração de triptase também foram correlacionadas positivamente. Foi observada ainda uma relação entre a presença e gravidade dos sintomas nos indivíduos asmáticos e as proporções/concentrações de eosinófilos, ECP, MBP, EDN e albumina nas amostras.

A substância utilizada para a dispersão das células nas amostras de escarro também pode influenciar os resultados (EFTHIMIADIS *et al.*, 1997). O uso do dithiothreitol (DTT) a 0,1% mostrou ser eficaz na dispersão das células provenientes do escarro, o que facilita a análise citológica da amostra. Efthimiadis e cols. (EFTHIMIADIS *et al.*, 1997) demonstraram que o uso isolado do DTT tratado com tampão de fosfato, que tem por finalidade interromper a ação do DTT, provoca uma diminuição não importante da viabilidade celular preservando os níveis de fibrinogênio e concentrações de interleucinas na fase fluída do escarro. O tratamento com o DTT ainda possibilita maior contagem

celular total e recuperação de níveis mais altos da proteína eosinofílica catiônica. Mais recentemente, Kelly e cols. (KELLY *et al.*, 2000), demonstraram que a medida de algumas interleucinas na fase líquida do escarro induzido pode ser afetada pelo uso do DTT e que isso pode ser prevenido pela adição de albumina.

1.4 CITOLOGIA DO ESCARRO INDUZIDO

A coloração das citospinas para a contagem celular diferencial do escarro induzido, tanto na pesquisa como na prática clínica, tem sido feita utilizando a coloração May-Grünwald-Giemsa ou Wright-Giemsa. Estas colorações fazem parte de um grupo chamado de “Colorações de Romanowsky”.

O termo “Corante de Romanowsky” é genérico para diferentes famílias de corantes compostas por soluções de azul de metileno policromático/azure B e eosina (HOROBIN, 2011). As metodologias variam de acordo com as proporções dos componentes (tiazinas e xantenos) presentes na formulação das soluções corantes (MARSHALL, BENTLEY E LEWIS, 1975). Apesar de amplamente usadas, essas técnicas tem a desvantagem de demandarem de muito tempo para a obtenção de uma coloração aceitável para a realização das análises.

A coloração hematológica rápida, também baseada na técnica de Romanowsky (LABORCLIN, 2005) utiliza reagentes similares, mas o tempo de coloração é consideravelmente menor. Esta metodologia utiliza três soluções de forma sequencial: a primeira é um agente fixador composto por metanol e corante triarilmetano; a segunda é composta por xantenos, solução tampão e azida sódica (solução eosinofílica); e a terceira é uma mistura de tiazinas em uma solução tampão (solução basofílica). Essa coloração tem sido amplamente utilizada em laboratórios de hematologia para realização do hemograma. Além disso, é uma alternativa para a coloração de Papanicolau (KELLOGG *et al.*, 1996) na detecção de *C. trachomatis* e para a avaliação da qualidade de amostras endocervicais. Esta coloração também pode ser utilizada para a detecção de *Pneumocystis Carinii* em amostras de escarro induzido e lavado alveolar (CREGAN *et al.*, 1990).

Na Tabela 1 estão apresentados os tipos celulares e a coloração que suas estruturas adquirem de acordo com o método da coloração hematológica rápida (Panótico) ou May-Grünwald-Giemsa

Tabela 1. Coloração celular e de suas estruturas de acordo com o método de coloração.

Tipo celular	Coloração hematológica rápida (Panótico)	May-Grünwald-Giemsa
Eritrócitos	Azul-Rosa	Rosa
Plaquetas	Roxo	Roxo
Neutrófilos	Núcleo azul/roxo, citoplasma rosado e grânulos roxos	Núcleo roxo, citoplasma rosa e grânulos roxos
Eosinófilos	Núcleo azul/roxo, citoplasma azulado e grânulos vermelhos	Núcleo roxo, citoplasma rosa e grânulos vermelhos
Linfócitos	Núcleo roxo e citoplasma azulado	Núcleo roxo e citoplasma azulado
Monócito/Macrófago	Núcleo violeta, citoplasma azul-claro	Núcleo violeta, citoplasma azul acinzentado

Adaptado de Marshall e cols (Marshall, Bentley e Lewis, 1975).

Outros métodos usados na citologia do escarro incluem colorações como o *Oil Red* e *Sudan Black* para determinar a presença de inclusões lipídicas no interior dos macrófagos (PARAMESWARAN *et al.*, 2000), azul de toluidina para identificar células metacromáticas (basófilos e mastócitos) (GAUVREAU *et al.*, 2000), azul da Prússia para identificar a presença de hemossiderina no interior dos macrófagos (ROY *et al.*, 2001) e o uso de imunohistoquímica (LEMIERE *et al.*, 2001).

1.5 VALORES NORMAIS DA CELULARIDADE DO ESCARRO

Os valores normais da celularidade do escarro estão bem determinados, podendo ocorrer variações regionais (PAVORD *et al.*, 1997; BELDA *et al.*, 2000; SPANEVELLO *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2011; VERAS *et al.*, 2011). Assim, é recomendável que laboratórios de diferentes regiões estabeleçam seus valores de normalidade. No ano 2000, foram publicados valores normais para a citologia de escarro

induzido em adultos saudáveis, residentes em Hamilton, Ontário Canadá (BELDA *et al.*, 2000). Este estudo mostrou predomínio de macrófagos e neutrófilos com eosinófilos ausentes ou em percentuais muito baixos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores normais para citologia de escarro em adultos.

Tipo celular	Média	2 desvios	Mediana	Percentil 90
Macrófago	58.8	100.8	60.8	86.1
Neutrófilo	37.5	77.7	36.7	64.4
Células Broncoepiteliais	1.6	9.4	0.3	4.4
Linfócitos	1.0	3.2	0.5	2.6
Eosinófilos	0.4	2.2	0.0	1.1
Células metacromáticas	0.0	0.1	0.0	0.04

Adaptado de Belda *et al.*, 2000 (Belda *et al.*, 2000).

Um estudo publicado recentemente (ARAUJO *et al.*, 2011) avaliou a segurança, sucesso e o perfil celular do escarro em crianças com asma (n=34) e controles (n=24). O procedimento teve alta taxa de sucesso na coleta tendo sido observado uma diferença significativa no perfil celular entre crianças asmáticas e saudáveis. Chama atenção a maior proporção de neutrófilos em relação aos macrófagos, o que não tem sido observado em adultos. Os valores obtidos no escarro de crianças saudáveis estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores obtidos na citologia de escarro em crianças saudáveis

Parâmetro	Média	Intervalo
Contagem celular total (x 10⁶/mL)	0.34	0.18 – 0.62
Neutrófilos (%)	41.9	25.0 – 62.0
Eosinófilos (%)	0.7	0.0 – 1.4

Linfócitos (%)	3.0	2.3 – 5.3
Macrófagos (%)	29.0	19.8 – 42.6
Células metacromáticas (%)	0.0	0.0 – 0.0
Células broncoepiteliais (%)	11.8	3.6 – 21.9

Adaptado de Araújo *et al.*, 2011 (Araujo *et al.*, 2011).

Em 2011, foi publicado um estudo realizado na cidade de Florianópolis, Santa Catarina que buscou estabelecer valores de referência para amostras de escarro de 88 indivíduos saudáveis (VERAS *et al.*, 2011). Os resultados deste estudo mostraram predominância de macrófagos, com percentuais de neutrófilos inferiores aos anteriormente publicados (Tabela 4).

Tabela 4. Valores para citologia de escarro em adultos saudáveis em Florianópolis

Contagem diferencial	Média (DP)	Mediana(II)	Percentil 10	Percentil 90
Eosinófilos	0,1 (0,3)	0 (0)	0	0,5
Neutrófilos	23,4 (14,3)	21,7 (21,0)	6,9	41,3
Macrófagos	68,4 (14,7)	71,0 (17,9)	4,7	86
Linfócitos	3,1 (2,4)	3,0 (3,0)	0	6,5
Células broncoepiteliais	5,2 (7,9)	2,8 (4,9)	0,5	13,3

Adaptado de Veras *et al.*, 2011 (Veras *et al.*, 2011).

DP = desvio-padrão

II = intervalo interquartilico

1.6 UTILIDADE DO EXAME DO ESCARRO

A metodologia de análise do escarro é útil em diversas doenças inflamatórias das vias aéreas (PAVORD *et al.*, 2002) sendo atualmente

considerada como essencial para a fenotipagem, do ponto de vista inflamatório, dessas doenças e para prever resposta ao tratamento, exacerbações e perda acelerada da função pulmonar (JATAKANON, LIM E BARNES, 2000). Assim, por exemplo, a resposta terapêutica a corticóides inalatórios (CIs) varia consideravelmente de acordo com a quantidade de eosinófilos no escarro (PAVORD *et al.*, 1999). Além disso, em asmáticos sintomáticos, apesar do tratamento com CIs, o percentual de eosinófilos no escarro é importante na escolha do tratamento adicional (KIPS *et al.*, 2000), e para o ajuste da dose medicamentosa (MORITZ *et al.*, 2008). O percentual de eosinófilos no escarro de indivíduos com DPOC também tem valor preditivo para a resposta ao tratamento com CIs, podendo ser utilizado como teste de triagem para definição da conduta terapêutica nestes casos (PAVORD *et al.*, 2002). Outras utilidades do exame do escarro induzido incluem o diagnóstico da bronquite eosinofílica (BRIGHTLING *et al.*, 1999), a ocorrência de microaspiração de conteúdo gastroesofágico (PARAMESWARAN *et al.*, 2000) e a definição de causas de tosse crônica.

1.7 JUSTIFICATIVA

A análise do escarro induzido, apesar de ser considerada padrão-ouro para a avaliação da inflamação das vias aéreas de forma minimamente invasiva, é um método muito laborioso, que demanda tempo e pessoal altamente treinado para a sua realização, o que faz com que ele seja pouco utilizado na prática clínica. Além do tempo necessário para a coleta, o processamento da amostra, que deve ser realizado em até duas horas após a obtenção do material, envolve diversos passos, entre eles seleção, diluições, pesagens e contagens, além do longo tempo necessário para a coloração final. Por exemplo, alguns indivíduos não conseguem fornecer uma amostra aceitável para o exame do escarro devido à contaminação por saliva, e a identificação desse tipo de escarro requer treinamento específico (PAVORD *et al.*, 1997). Além disso, somente o tempo para a coloração pode levar até 34 minutos. O encurtamento do tempo total de processamento seria muito importante para maior viabilidade da metodologia.

Atualmente, existem kits que padronizam o processamento do escarro, porém esses kits tem a desvantagem do custo elevado, sem diminuir o tempo de processamento (PIZZICHINI, PIZZICHINI E HARGREAVE, 2004). A automação para a análise do escarro induzido seria uma alternativa para reduzir o tempo requerido, mas até o presente,

isso tem sido impossibilitado pela presença de células não circulantes, como por exemplo macrófagos, células escamosas e broncoepiteliais. Uma forma de diminuir o tempo e os custos do processamento do escarro seria o uso da coloração hematológica rápida. Por esse motivo, a validação dessa metodologia é importante para países em desenvolvimento, tais como o Brasil.

A coloração May-Grünwald-Giemsa utilizada pelo Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) atualmente, é realizada pelo equipamento automatizado Sysmex SP1000iTM (Sysmex CO.), e tem um custo aproximado de R\$1,00 por citospina. Quando comparado com a coloração hematológica rápida (corante panótico), o custo da coloração padrão é significativamente mais alto, uma vez que o custo aproximado do corante panótico é de R\$ 0,05 por lâmina.

Com a utilização da coloração hematológica rápida, pretende-se diminuir o tempo de análise em até 32 minutos, facilitando a utilização da técnica na prática clínica e otimizando o processo como um todo. Além disso, a forma simplificada de coloração e seu baixo custo possibilitam sua utilização em laboratórios de médio e pequeno porte. Contudo, antes de aplicar esta técnica para a coloração do escarro induzido, é necessário examinar sua confiabilidade.

2 HIPÓTESES

2.1 HIPÓTESE NULA: $H_0: P \neq P_0$

ρ = coeficiente de correlação intra-classe (CCI) da coloração May-Grünwald-Giemsa,

ρ_0 = CCI da coloração hematológica rápida (panótico).

2.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA: $H_1: P = P_0$

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a confiabilidade da coloração hematológica rápida para a análise celular do escarro induzido visando a diminuição do tempo e custo do processamento das amostras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a confiabilidade das contagens celulares entre observadores e intra-observador para os dois tipos de coloração.
- Avaliar o grau de concordância na detecção de escarro eosinofílico (eosinófilos $\geq 3,0\%$) e de escarro neutrofílico (neutrófilos $\geq 64,0\%$) entre observadores e intra-observador para os dois tipos de coloração.

4 MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal para validar uma técnica alternativa de coloração das citospinas do escarro induzido. Para tanto foi comparada a técnica padrão (May-Grünwald-Giemsa) com a coloração hematológica rápida (pelo corante panótico). Após processamento do escarro induzido foram produzidas quatro citospinas das quais duas foram coradas pelo método padrão e as outras duas foram coradas pelo método do estudo. As citospinas foram lidas independentemente, por duas bioquímicas (JG e SCF) com treinamento em hematologia e qualificadas para a leitura do escarro induzido. As leituras foram feitas em citospinas codificadas impedindo que os leitores das lâminas identificassem seus respectivos pares ou resultados de leituras anteriores.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no NUPAIVA, localizado no Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O processamento das amostras foi realizado no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, e as colorações e contagens das citospinas foram realizadas no laboratório de Hematologia do Serviço de Análises Clínicas (HU/UFSC).

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo realizado foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC através do Certificado nº 2093 (Processo: 2093 e FR: 437236), emitido em 28/11/2011 (ANEXO I). Todos os participantes assinaram o devido “Consentimento Informado” após explicação detalhada do estudo (APÊNDICE I).

4.4 TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi estimado conforme o cálculo amostral para análise de CCI (ρ) proposto por Walter SD e cols (WALTER, ELIASZIW E DONNER, 1998). O cálculo foi feito considerando os

seguintes parâmetros (1) dois observadores, (2) com uma diferença entre CCI's de 0.1, (3) α (dois lados) = 5% e, (4) β de 20% (poder de 80%). A amostra foi estimada em 49 participantes. Para obter maior variabilidade na contagem celular diferencial foram escolhidos três grupos de participantes: portadores de asma (Grupo I), DPOC (Grupo II) e participantes hígidos sem sintomas respiratórios (Grupo III). O tamanho final da amostra foi de 60 participantes antecipando uma perda de 20% por falha na indução do escarro.

4.5 PARTICIPANTES

Os participantes foram selecionados no Ambulatório de Pneumologia do HU/UFSC e de outros serviços de pneumologia da cidade de Florianópolis. A seleção dos mesmos ocorreu de forma sequencial e quando das visitas ambulatoriais a esses serviços. Todos os participantes foram voluntários e preencheram os critérios pré-estabelecidos de inclusão e exclusão abaixo discriminados:

4.5.1 Critérios de inclusão

Asmáticos (Grupo I)

- a) Asmáticos adultos com idade superior a 18 anos e que apresentem asma não controlada caracterizada por um escore do Questionário de Controle da Asma (ACQ) (JUNIPER et al., 1999) superior a 1.7 unidades na última semana e confirmados objetivamente (nos últimos 3 anos) por limitação reversível ao fluxo de ar (aumento do Volume Expirado Forçado no primeiro segundo (VEF1) > 12% e superior a 200ml após a inalação de broncodilatador de curta duração) nos participantes com limitação ao fluxo de ar das vias aéreas (VEF1 /Capacidade Vital Forçada (CVF) <0,7);
- b) Nunca terem fumado ou não fumantes por mais de um ano e com história de tabagismo menor que dez maços/ano;
- c) Livres de infecção viral das vias aéreas nas últimas quatro semanas;
- d) Capazes de produzir escarro induzido;
- e) Capazes de fornecer consentimento informado antes do estudo.

DPOC (Grupo II)

- a) Homens ou mulheres com idade superior a 40 anos e história de sintomas respiratórios associados à obstrução moderada ou grave ao fluxo de ar ($VEF_1 < 50\%$ do previsto com um $VEF_1/CVF < 0.7$) das vias aéreas;
- b) Em uso de qualquer tipo de medicação para DPOC;
- c) História de tabagismo importante (atual ou prévia) com uma carga tabágica > 20 maços/ano;
- d) Livres de infecção respiratória no último mês;
- e) Capazes de produzir escarro induzido;
- f) Capazes de fornecer consentimento informado antes do estudo

Assintomáticos para doenças respiratórias (Grupo III)

- a) Caracterizados pela ausência de sintomas respiratórios e confirmados objetivamente por espirometria normal;
- b) Nunca terem fumado ou não fumantes por mais de dois anos e com história de tabagismo menor que cinco maços/ano;
- c) Não estarem utilizando nenhuma medicação sistêmica e estarem livres de infecção respiratória nas últimas quatro semanas;
- d) Capazes de produzir escarro induzido;
- e) Capazes de fornecer consentimento informado antes do estudo.

4.5.2 Critérios de Exclusão:

- a) Infecção respiratória nas últimas quatro semanas;
- b) Outras doenças pulmonares conhecidas (fibrose cística, pneumonia, etc.);
- c) Doenças graves de outros aparelhos ou sistemas ou uso de medicações que possam confundir os resultados;
- d) Mulheres grávidas.

4.6 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Os participantes que preencheram todos os critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão foram convidados a participar do projeto de pesquisa. O estudo foi detalhadamente explicado e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os participantes foram submetidos aos procedimentos descritos abaixo:

- a) Os dados demográficos foram registrados em um questionário estruturado e incluíram idade, sexo, raça, peso, altura, data do diagnóstico de asma brônquica ou DPOC, início do tratamento específico para a asma ou DPOC e co-morbidades ;
- b) Espirometria pré e pós broncodilatador foi realizada de acordo com as especificações da *American Thoracic Society* (ATS, 1995) em um espirômetro computadorizado (*Koko Spirometer*, PDS Instrumentation, Louisville, USA). Os valores previstos da normalidade são os publicados por Crapo e cols. (CRAPO, MORRIS E GARDNER, 1981);
- c) Indução do escarro de acordo com a metodologia descrita por Pizzichini e cols. (PIZZICHINI *et al.*, 1996). Em síntese, o procedimento foi iniciado após uma espirometria pré e pós-broncodilatador para obtenção dos valores basais. A indução do escarro implicou na inalação de um aerossol de solução salina isotônica (0,9%) seguida por solução salina hipertônica (3, 4 e 5%), produzido por um nebulizador ultrassônico *Fisoneb* (*Canadian Medical Products Ltd.*, Markham, Ontario). A inalação do aerossol foi mantida por um ou dois minutos, de acordo com a gravidade da broncoconstrição presente antes do procedimento, seguida pela mensuração do VEF₁. Os participantes foram orientados a enxaguar a boca, engolir a água e assoar o nariz para diminuir a contaminação com saliva ou descarga pós-nasal. A seguir, foram instruídos a tossir e depositar o escarro em um recipiente limpo. Esses procedimentos foram consecutivamente repetidos, aumentando-se a concentração da solução a cada sete minutos, até completar 21 minutos ou até que ocorresse uma queda do VEF₁ igual ou superior a 20%.

- d) O processamento do escarro foi realizado dentro de duas horas de acordo com a técnica descrita por Pizzichini e cols. (PIZZICHINI *et al.*, 1996). Inicialmente, as porções densas do material expectorado foram selecionadas a olho nu ou, se necessário, sob visualização através de um microscópio invertido, utilizando-se um fórceps para separar o escarro da saliva. A fração selecionada foi colocada em um tubo de poliestireno e tratada com quatro vezes o seu volume de ditiotreitol (DTT) a 0,1% (*Sputalysin 10%*; Calbiochem Corp., San Diego, CA). Esta mistura foi agitada por 15 segundos e consecutivamente aspirada e ejetada através de uma pipeta de Pasteur. O tubo de poliestireno foi então colocado em um agitador de mesa (*Dade Tube Rocker*; Baxter Diagnostics Corporation, Miami, FL) e agitado por 15 minutos. Para sustar o efeito do DTT sobre a suspensão de células, foi adicionada solução salina tamponada em fosfato de Dulbecco (D-PBS) em quantidade correspondente a quatro vezes o volume inicial de escarro selecionado. A suspensão resultante foi filtrada em um filtro de náilon com microporos de 48µm (*BBS Thompson*, Scarborough, Ontario) para remover os restos celulares e o muco não dissolvido. Em seguida, foi realizada a contagem celular total de leucócitos, excluindo-se as células escamosas utilizando-se um hemocitômetro de Neubauer modificado. A viabilidade celular foi determinada através do método de exclusão pelo *trypan blue* (as células mortas aparecem em azul). Sessenta a oitenta microlitros da suspensão, ajustada para $1.0 \times 10^6/\text{mL}$, foram colocados em recipientes para uma citocentrífuga *Shandon III* (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) e quatro citospinas codificadas foram preparadas a 450rpm por 6min. Depois de secar ao ar livre, duas citospinas foram coradas pelo corante de May-Grünwald-Giemsa e duas citospinas coradas pelo corante do estudo (coloração hematológica rápida) para a contagem diferencial de células, sendo que 400 células não escamosas foram contadas na lâmina de melhor qualidade de cada coloração. Os dois leitores foram cegados para as características clínicas dos pacientes e as lâminas

codificadas, impossibilitando a identificação dos respectivos pares de citospinas ou acesso a resultados anteriores.

A coloração de May-Grünwald-Giemsa foi realizada pelo corador automatizado Sysmex SP1000iTM (Sysmex CO.). Nesse método as lâminas foram fixadas por imersão em metanol P.A. durante 5-10 minutos, seguindo-se a imersão em solução de corante de May-Grünwald durante 3 minutos, e posteriormente em solução de May-Grünwald diluída (1:1) por 3 minutos. Logo após, as lâminas foram imersas, durante 15 minutos, em solução de corante Giemsa fresca, diluída 1:10 e posteriormente secas. O procedimento completo durou cerca de 34 minutos (Figura 1).

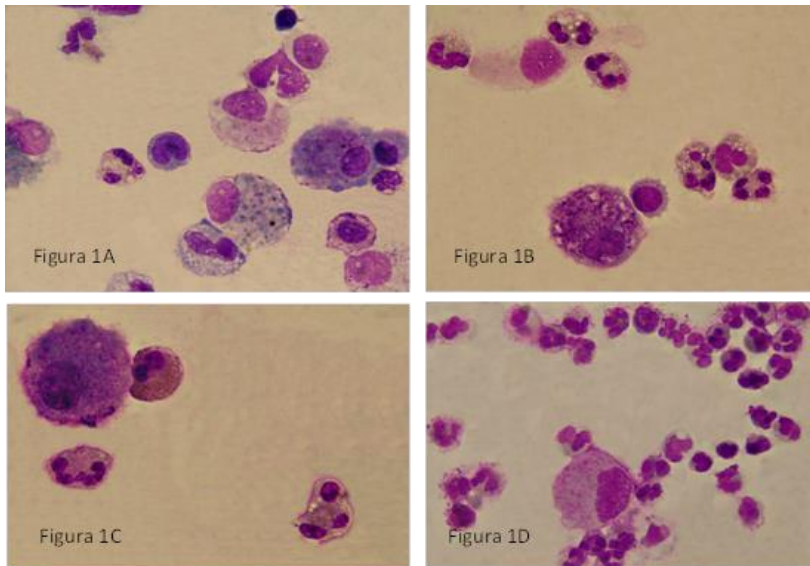


Figura 1. Citospinas de escarro induzido coradas pela coloração de May-Grünwald-Giemsa.

Figura 1A mostra macrófagos com inclusões de fumante, neutrófilos e linfócito. A Figura 1B mostra neutrófilos, macrófago, linfócito e célula broncoepitelial. A figura 1C mostra neutrófilos, macrófago e eosinófilo. Figura 1D mostra neutrófilos e macrófago.

A coloração hematológica rápida foi feita manualmente. O processo iniciou com a imersão das lâminas na solução nº1 (solução de triarilmetano a 0,1%) mantendo um movimento contínuo para cima e para baixo por 5 a 10 segundos (5 a 10 imersões de 1 segundo cada) e deixando escorrer. Em seguida, as extensões foram imersas na solução nº2 (solução de xantenos a 0,1%), repetindo o mesmo procedimento do corante nº1. Após escorrer, as lâminas foram imersas no corante nº3 (solução de tiazinas a 0,1%) e novamente repetido o procedimento realizado nas duas soluções anteriores. As lâminas foram enxaguadas com água destilada e deixadas ao ar livre para secagem (LABORCLIN, 2005). Esta técnica de coloração levou no máximo 2 minutos (Figura 2).

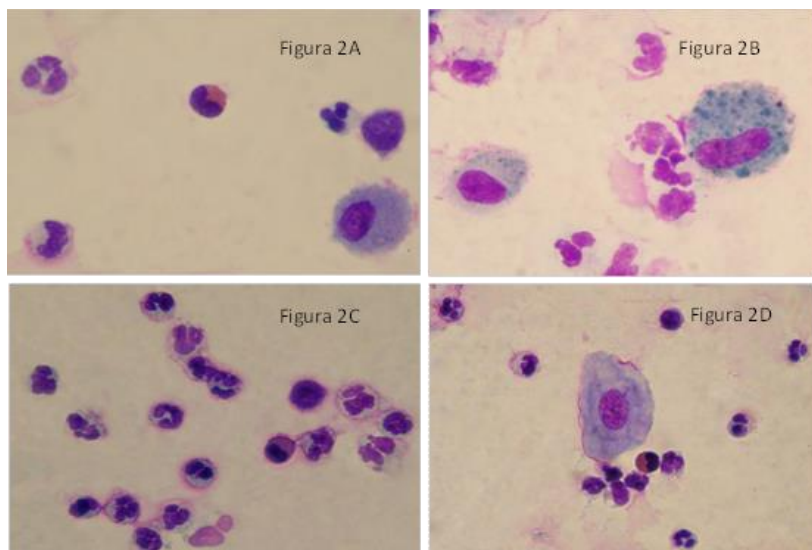


Figura 2. Citospinas de escarro induzido coradas pela coloração hematológica rápida.

A Figura 2A mostra um eosinófilo, macrófagos e neutrófilos. Figura 2B mostra macrófagos com inclusões de fumante e neutrófilos. Figura 2C mostra neutrófilos e macrófagos. Figura 2D mostra neutrófilos, eosinófilo, macrófago e célula do epitélio salivar.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados de distribuição normal estão resumidos em forma de média e desvio padrão. Dados de distribuição não normal estão

expressos como mediana e a amplitude do intervalo interquartil (percentis 10 e 90). Variáveis categóricas estão apresentadas como percentuais. A confiabilidade do método estudado foi aferida pela concordância intra-observador (coloração padrão versus coloração do estudo) e entre observadores (coloração padrão versus coloração do estudo) para as contagens celulares dos dois métodos por meio do CCI e graficamente apresentados de acordo com Bland-Altman (BLAND E ALTMAN, 1995). A interpretação do CCI, foi baseada na classificação proposta por Landis e Koch (LANDIS E KOCH, 1977) onde um CCI <0 indica “pobre confiabilidade”, de 0 a 0,20 “confiabilidade fraca”, de 0,21 a 0,4 “confiabilidade razoável”, de 0,41 a 0,60 “confiabilidade moderada”, de 0,61 a 0,8 “confiabilidade substancial, e >0,81 “confiabilidade quase perfeita”. A concordância na identificação de escarro eosinofílico (eosinófilos $\geq 3\%$) (JAYARAM *et al.*, 2006) e de escarro neutrofílico (neutrófilos $> 64\%$) (BELDA *et al.*, 2000) entre observadores e entre as duas colorações foi calculada usando o Kappa estatístico e a interpretação dos resultados foi baseada nos pontos de corte propostos por Landis e Koch (LANDIS E KOCH, 1977). Diferenças entre as características dos grupos do estudo foram examinadas por ANOVA e pelo teste de Bonferroni na análise *post hoc*. Todos os testes estatísticos foram bi-caudados e o nível de significância aceito foi de 5%. Todas as análises foram feitas usando o pacote estatístico SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences* for Windows, versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5 RESULTADOS

O processo de indução do escarro foi realizado em 62 indivíduos, dos quais 50 (80,6%) foram capazes de fornecer uma amostra adequada para leitura. Doze amostras de escarro induzido foram consideradas inadequadas devido a um ou mais dos seguintes fatores: (1) elevada contaminação salivar (>20% de células escamosas), (2) baixa viabilidade celular (< 50%) e/ou, (3) material insuficiente para a confecção das citospinas. As características demográficas, clínicas e funcionais dos participantes cujo escarro foi estudado estão apresentadas na tabela 5. Os grupos foram distintos e bem caracterizados como demonstrado pelas diferenças demográficas, clínicas e funcionais.

Tabela 5. Características demográficas, clínicas e funcionais dos participantes*.

Característica	Asma n= 21	DPOC n = 19	Controles n=10	p
Idade, anos	47,3 (22 - 68)	62,8 (52 - 77)	38,4(21- 58)	p <0,001 ^{†¶} , p= 0,2 [§]
Gênero, feminino	12 (57%)	05 (26,3%)	07 (70,0%)	p = 0,03
VEF₁ pré-BD,%	55,3 (11,9)	50,2(18,2)	102,2(7,8)	p=0,1 [†] , p<0,001 ^{§¶}
VEF₁ pós-BD,%	64,9 (11,7)	52,7 (18,2)	104,5 (8,7)	p=0,02 [†] , p<0,001 ^{§¶}
VEF₁/CVF pré-BD,%***	58,3 (9,5)	52,5(13,8)	80,4 (5,0)	p=0,4 [†] , p<0,001 ^{§¶}
VEF₁/CVF pós-BD,%***	61,3 (9,2)	53,2 (14,4)	82,4 (4,6)	p= 0,06 [†] , p<0,001 ^{§¶}
Δ VEF₁ pós BD, L	0,29(0,29)	0,07(0,09)	0,08 (0,08)	p=0,003 [†] , p=0,02 [§] , p=1,0 [¶]
Δ VEF₁ pós BD, %	19,1 (17,6)	6,1 (7,4)	2,5 (2,4)	p=0,005 [†] , p=0,002 [§] , p=1,0 [¶]

*Os dados de distribuição normal estão expressos como média e desvio padrão ou mínimo e máximo. Variáveis dicotômicas estão expressas como percentuais exceto quando especificado de outra forma.

VEF₁ = Volume Expirado Forçado no primeiro segundo. CVF = Capacidade Vital Forçada. ***Os valores previstos para VEF₁ e CVF são os de Crapo e cols.(Crapo, Morris e Gardner, 1981).

† = Asma vs. DPOC, § = Asma vs. Controle, ¶ = DPOC vs. Controle

5.1 CELULARIDADE TOTAL E DIFERENCIAL DO ESCARRO INDUZIDO

A Tabela 6 mostra a viabilidade celular e as contagens celular total (CCT) e diferencial de cada grupo, obtidas pelo método padrão. As características celulares do escarro induzido foram aquelas esperadas para os diferentes grupos do estudo. Quando comparados com portadores de DPOC e controles saudáveis, o escarro dos asmáticos caracterizou-se por um percentual significativamente maior de eosinófilos. Em contraste, o escarro dos portadores de DPOC apresentou um aumento significativo da contagem celular total e do percentual de neutrófilos do que o grupo controle. O grupo controle teve um percentual significativamente maior de macrófagos que os outros dois grupos.

Tabela 6. Contagem celular* total (CCT) e diferencial do escarro induzido*

	Asma	DPOC	Controles	p
n	21	19	10	
Viabilidade, %	87,0 (70,2; 94,7)	90,4 (77,9; 96,8)	74,2 (58,6;94,4)	p=0,01 [¶]
CCT x 10⁶/mg	8,3 (3,2; 18,6)	11,3 (5,9; 26,0)	5,5 (2,7;15,7)	p=0,01 [¶]
Neutrófilos %	56 (18,0; 86,7)	76,5 (34,6 88,5)	41,5 (13,3;86,0)	p=0,01 [¶]
Eosinófilos %	2,3 (0,0; 46,7)	0,3 (0,0;3,3)	0 (0,0; 0,5)	p=0,01 ^{†¶} , p<0,01 [§]
Macrófagos %	28 (6,3; 59,2)	20,7 (10,7;54,0)	56,8(12,4; 82,1)	p=0,01 ^{†§} , p=0,03 [¶]
Linfócitos %	1,0 (0,2; 2,7)	0,5 (0,0; 2,2)	0,85 (0,2; 1,9)	NS

*expresso como mediana (10; 90 percentis)

† = asma vs. DPOC

§ = asma vs. Controle

¶ = DPOC vs. controle

A Figura 3 mostra os percentuais de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos nos diferentes grupos do estudo. Na figura 4 a mediana dos percentuais de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, em toda a amostra estudada, estão separadas pelo tipo de coloração empregada. Observa-se que não houveram diferenças entre as contagens das citospinas coradas pelos dois métodos do estudo.

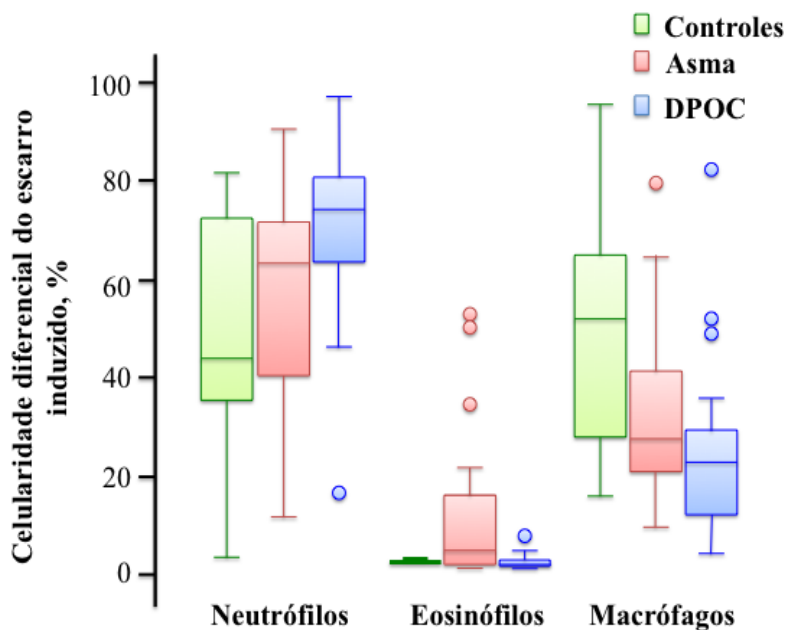


Figura 3 Celularidade diferencial no escarro induzido dos três grupos do estudo. .

Barras horizontais = medianas. Linhas verticais superiores = percentil 75. Linhas verticais inferiores = percentil 25. Círculos = valores atípicos.

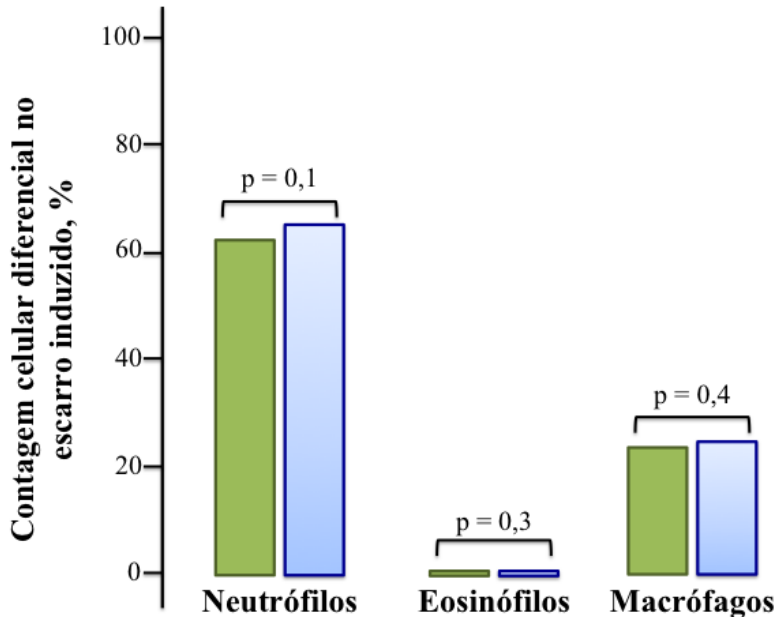


Figura 4. Contagem celular diferencial (mediana) em citospinas coradas com May-Grünwald-Giemsa (em verde) e pela coloração hematológica rápida (em azul).

5.2 CONCORDÂNCIA ENTRE OBSERVADORES NA AFERIÇÃO DA CITOLOGIA DIFERENCIAL

Os resultados da análise da concordância entre observadores na contagem celular diferencial do escarro induzido em citospinas coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa estão apresentados na Tabela 7 e Figuras 5 a 7. Como pode ser observado, as medianas e percentis entre os observadores foram similares. Os CCIs apontaram concordância quase perfeita para as leituras de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos. A concordância para a leitura de linfócitos foi substancial. O mesmo pode ser observado com relação às citospinas coradas pelo método da coloração hematológica rápida (Tabela 8). Novamente, as medianas e percentis entre os observadores ficaram muito próximas, e os CCIs apontaram concordância quase perfeita para as contagens de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos.

Tabela 7. Concordância entre observadores na contagem celular diferencial* do escarro induzido em citospinas coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa

Tipo Celular	Observador 1	Observador 2	CCI
Neutrófilos %	65,5 (19,9; 87,2)	64,3 (22,2; 83,9)	0,99 (0,99; 1,0)
Eosinófilos %	0,4 (0,0; 15,7)	0,8 (0,0; 17,7)	1,0 (0,99; 1,0)
Macrófagos %	26,7 (10,8; 66,8)	27,2 (13,1; 67,6)	0,98 (0,96; 0,99)
Linfócitos %	1,0 (0,0; 2,2)	0,8 (0,0; 2,2)	0,76 (0,58; 0,87)

*mediana e percentis 10 e 90

Tabela 8. Concordância entre observadores na contagem celular diferencial* do escarro induzido em citospinas coradas pelo método da coloração hematológica rápida

Tipo Celular	Observador 1	Observador 2	CCI**
Neutrófilos	63,4 (19,9; 81,7)	62,5 (19,3; 80,4)	0,99 (0,98;1,00)
Eosinófilos	0,7 (0,0; 13,0)	1,00 (0,0; 15,4)	1,0 (0,99; 1,00)
Macrófagos	27,3 (14,0; 65,5)	27,9 (15,5; 61,7)	0,99 (0,99; 1,00)
Linfócitos	0,7 (0,0; 3,0)	1,0 (0,0; 2,6)	0,83 (0,71; 0,91)

*mediana e percentis 10 e 90, **CCI e intervalo de confiança de 95%

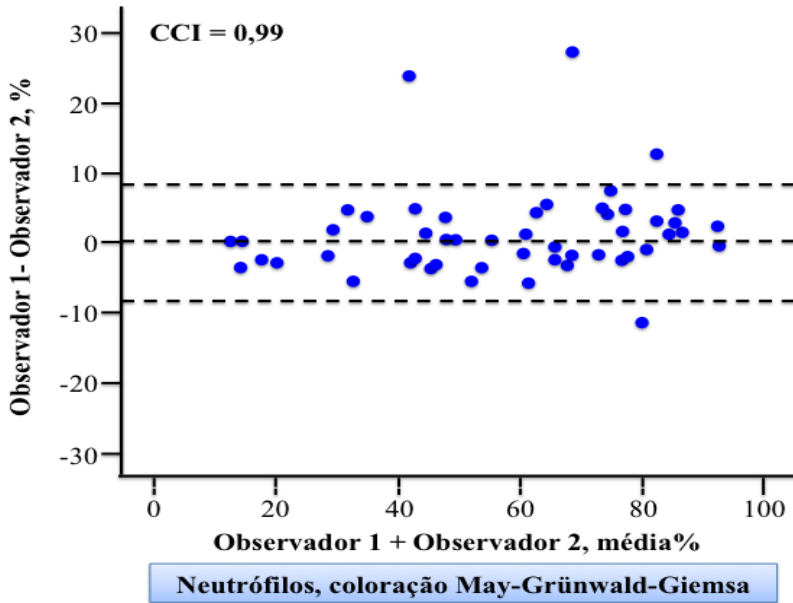


Figura 5. Reprodutibilidade entre observadores dos percentuais de neutrófilos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).

As plotagens se referem às diferenças entre as leituras dos observadores 1 e 2 (eixo Y) em relação a média das leituras dos observadores 1 e 2 (eixo X). A linha interrompida central indica ausência de diferenças e as linhas interrompidas periféricas indicam dois desvios padrões da média das diferenças. CCI = coeficiente de correlação intraclassa.

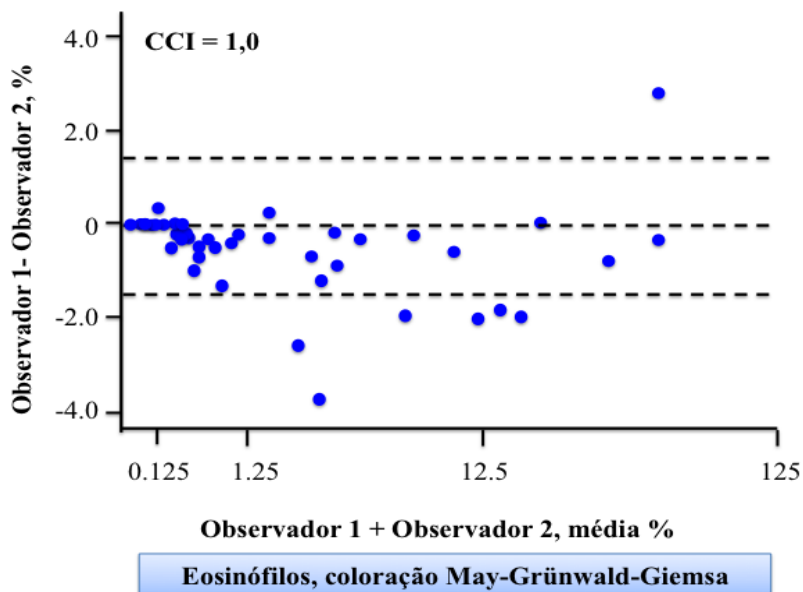


Figura 6. Reprodutibilidade entre observadores dos percentuais de eosinófilos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995). Legendas conforme figura 5.

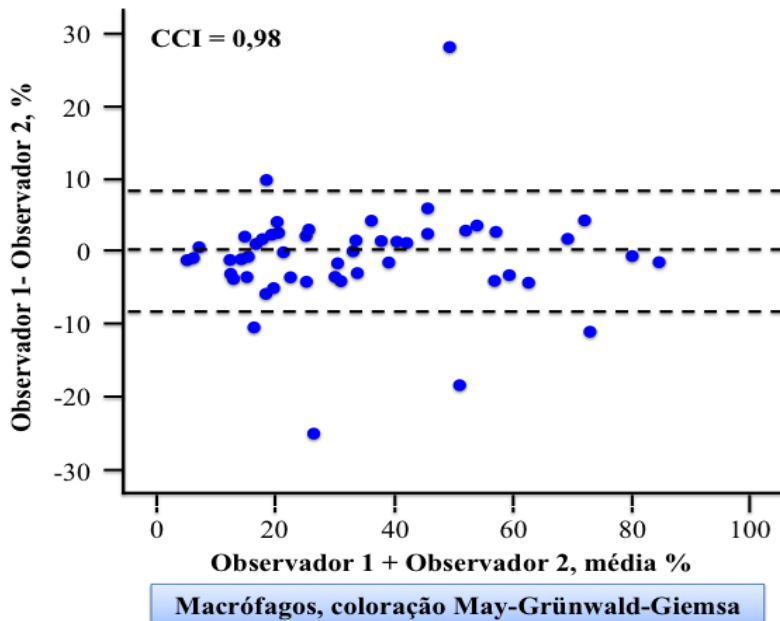


Figura 7. - Reprodutibilidade entre observadores dos percentuais de macrófagos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995). Legendas conforme figura 5.

5.3 CONCORDÂNCIA DA CITOLOGIA DIFERENCIAL INTRA-OBSERVADOR

Os valores do coeficiente de correlação intraclassa para os observadores 1 e 2 na contagem celular diferencial dos pares de citospinas coradas pelos dois métodos do estudo, indicaram uma concordância intra-observador quase perfeita para neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (Tabela 9). A concordância dos observadores 1 e 2, nas contagens de linfócitos, foi substancial. As concordâncias intra-observador, na contagem dos neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, estão exemplificadas nas figuras 8 a 10.

Tabela 9. Concordância intra-observador entre as contagens celulares realizadas em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa e pela coloração hematológica rápida

Tipo celular	Observador 1	Observador 2
Neutrófilos	0,97 (0,95; 0,98)	0,97 (0,94; 0,98)
Eosinófilos	0,99 (0,98; 0,99)	0,98 (0,96; 0,99)
Macrófagos	0,96 (0,94; 0,98)	0,96 (0,93; 0,98)
Linfócitos	0,75 (0,55; 0,86)	0,65 (0,38; 0,80)

*CCI e intervalo de confiança de 95%

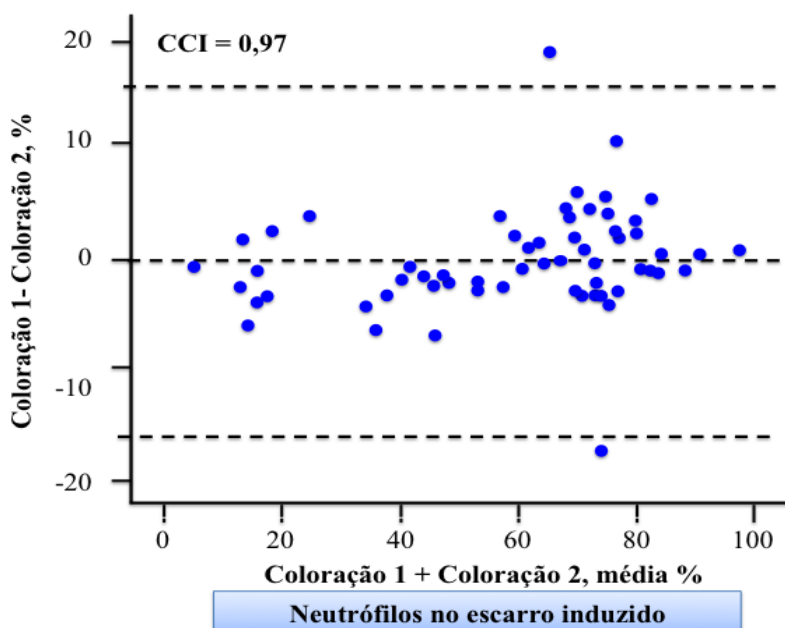


Figura 8. Reprodutibilidade intra-observador na contagem diferencial dos neutrófilos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa e pelo método hematológico rápido, mostrado como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).

As plotagens se referem a diferença entre as leituras das citospinas coradas pelos dois métodos do estudo (eixo Y) em relação a média das leituras feitas em cada citospinas (eixo X). A linha interrompida central indica ausência de diferenças e as linhas interrompidas periféricas indicam dois desvios padrões da média das diferenças. CCI = coeficiente de correlação intraclasse.

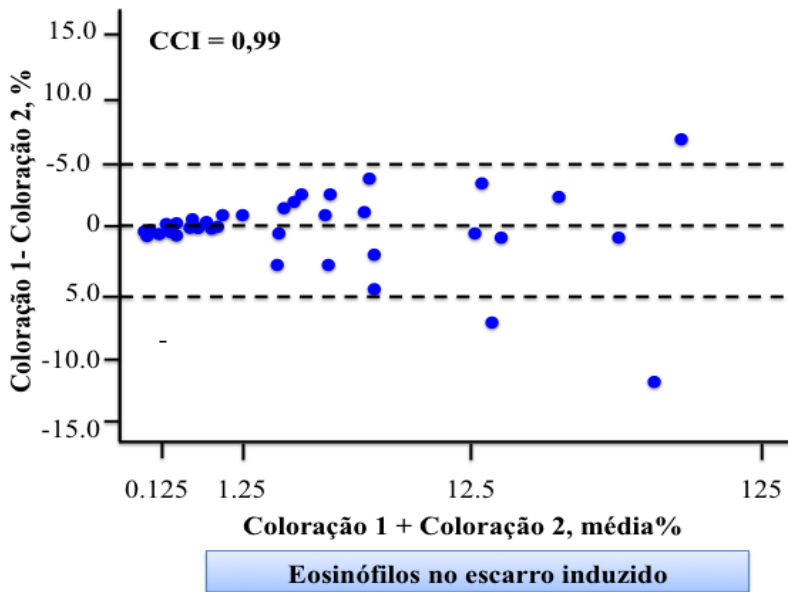


Figura 9. Reprodutibilidade intra-observador na contagem diferencial dos eosinófilos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa e pelo método hematológico rápido, mostrado como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995).

Legendas conforme Figura 8.

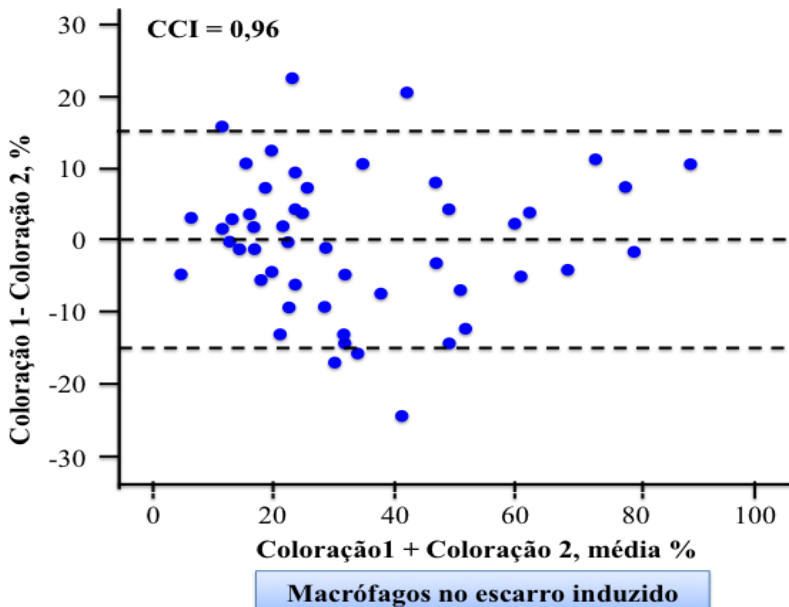


Figura 10. Reprodutibilidade intra-observador na contagem diferencial dos macrófagos no escarro induzido em citospinas coradas por May-Grünwald-Giemsa e pelo método hematológico rápido, mostrado como proposto por Bland e Altman (BLAND E ALTMAN, 1995)

Legendas conforme figura 8.

5.4 CONCORDÂNCIA ENTRE OBSERVADORES E INTRA-OBSERVADOR NA IDENTIFICAÇÃO DE ESCARRO EOSINOFÍLICO E NEUTROFÍLICO

A concordância entre observadores na identificação de escarro eosinofílico e neutrofílico em citospinas coradas pelos dois métodos do estudo foi de substancial a quase perfeita, conforme demonstrado nas tabelas 10 e 11. No entanto, observa-se que a concordância intra-observador, embora considerada substancial, foi inferior do que aquela entre observadores.

Tabela 10. Concordância entre observadores para identificação de escarro eosinofílico e neutrofílico na avaliação de lâminas coradas pelos dois métodos do estudo.

Coloração	Tipo de escarro	Kappa	p
<u>Hematológica Rápida</u>	Eosinofílico	1,0	<0,001
	Neutrofílico	1,0	<0,001
<u>May-Grünwald-Giemsa</u>	Eosinofílico	0,905	<0,001
	Neutrofílico	0,960	<0,001

Tabela 11. Concordância intra-observador para identificação de escarro eosinofílico e neutrofílico na avaliação de lâminas coradas pelos dois métodos do estudo.

	Tipo de escarro	Kappa	p
<u>Observador 1</u>	Eosinofílico	0,746	<0,001
	Neutrofílico	0,801	<0,001
<u>Observador 2</u>	Eosinofílico	0,758	<0,001
	Neutrofílico	0,760	<0,001

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que citospinas coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa e com o corante hematológico rápido permitem contagens celulares semelhantes com elevados índices de concordância intra-observador e entre observadores. Estes resultados demonstram a confiabilidade do método da coloração hematológica rápida no processamento do escarro induzido. Isto é relevante porque o método da coloração hematológica rápida é mais simples, permite a redução no tempo de processamento do escarro sem prejudicar a qualidade da amostra, além de ser consideravelmente mais barato.

Este estudo foi o primeiro a analisar a confiabilidade do método da coloração hematológica rápida para citologia do escarro induzido, comparando-o com um método de coloração tradicional, o método de May-Grünwald-Giemsa. A análise da confiabilidade ou reprodutibilidade dos resultados é importante para confirmar a acurácia dos resultados obtidos usando a coloração hematológica rápida. No presente estudo, a análise da confiabilidade da coloração hematológica rápida foi testada usando duas estratégias distintas.

A primeira estratégia foi o cálculo do CCI realizado para as contagens celulares por dois observadores independentes cegados para a identificação das citospinas. Embora as colorações utilizadas no presente estudo pudessem ser identificadas pelo aspecto da citospina, códigos diferenciados foram usados para impedir a identificação dos respectivos pares de citospinas. Estudos anteriores (EFTHIMIADIS, 1995; SPANEVELLO *et al.*, 1997; WARD *et al.*, 1999) já haviam demonstrado que a concordância intra-observador e entre observadores nas contagens de citospinas coradas com Wright-Giemsa e May-Grünwald-Giemsa podia ser considerada perfeita, mas que isso dependia do grau de contaminação salivar destas citospinas (WARD *et al.*, 1999). Os resultados do presente estudo usando a coloração hematológica rápida estão alinhados com estas publicações.

A segunda estratégia foi examinar a confiabilidade da coloração hematológica rápida na identificação de escarro eosinofílico e de escarro neutrofílico. Isso é relevante em função do emprego do exame de escarro na prática clínica para fenotipar a asma grave, prever a resposta ao tratamento e diminuir o número de exacerbações da asma por meio do controle da inflamação eosinofílica.

A análise da concordância entre os dois métodos de coloração, na identificação de escarro eosinofílico ou neutrofílico, realizada por um mesmo observador (intra-observador) indicou que esta era substancial. Além disso a concordância entre observadores, na identificação de

escarro eosinofílico ou neutrofílico, foi quase perfeita. Esses resultados novamente demonstram a confiabilidade da coloração hematológica rápida, por demonstrar a acurácia na identificação dos diferentes fenótipos inflamatórios.

Contudo, os resultados também mostraram que concordância na identificação dos fenótipos foi maior entre observadores do que intra-observador. Esta diferença poderia ser explicada pela presença de variabilidade do conteúdo celular entre as citospinas coradas pelos dois métodos do estudo. Embora a concordância intra-observador tenha sido substancial, este resultado em particular, sugere cautela e necessidade de estudos posteriores para identificar a razão desta variabilidade.

A reprodutibilidade das contagens diferenciais de leucócitos entre observadores em amostras de escarro induzido já havia sido relatada anteriormente (EFTHIMIADIS, 1995; SPANEVELLO *et al.*, 1997; WARD *et al.*, 1999). Em 1997, Spanevello e cols. obtiveram alto índice de reprodutibilidade entre as leituras de observadores distintos, para todos os tipos celulares estudados. Esse mesmo trabalho encontrou um menor índice de concordância para os linfócitos, quando comparado com os demais tipos celulares. A menor concordância para os percentuais de linfócitos foi considerada consequência da presença de um percentual muito pequeno desse tipo celular nas amostras de escarro induzido. No presente estudo também encontramos menor concordância entre as contagens de linfócitos, porém, isso não foi enfatizado devido ao fato conhecido de que essas variações não tem relevância clínica.

Dados publicados em 1999 por Ward e cols. (WARD *et al.*, 1999), mostraram uma boa reprodutibilidade entre diferentes observadores para as contagens de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos sendo que, novamente, a reprodutibilidade para as contagens de linfócitos foi menor. Estes autores justificaram o menor índice de reprodutibilidade não apenas à escassez dos linfócitos nas amostras, mas também à dificuldade no reconhecimento destas células. Além disso, Ward e cols. (WARD *et al.*, 1999) confirmaram os resultados de publicações anteriores (EFTHIMIADIS, 1995), demonstrando que a reprodutibilidade da análise diferencial da celularidade do escarro induzido é afetada pela contaminação salivar e baixa viabilidade celular. No presente estudo, amostras com contaminação salivar >20% ou com viabilidade < 50% foram consideradas inadequadas para análise.

Métodos de refinamento do exame do escarro em muito contribuíram para a sua acurácia e reprodutibilidade (EFTHIMIADIS *et al.*, 2002). Contudo, os estudos anteriores focaram predominantemente nas etapas anteriores à obtenção das citospinas e da fase líquida do

escarro (POPOV *et al.*, 1995; PIZZICHINI *et al.*, 1996; EFTHIMIADIS *et al.*, 1997; KELLY *et al.*, 2000).

Em 2003, foi publicado um estudo que comparou os resultados e custos de três técnicas de análise do escarro induzido (SARAIVA-ROMANHOLO *et al.*, 2003). As metodologias variavam entre (1) a confecção do esfregaço a partir do escarro sem o tratamento com o DTT, (2) confecção de esfregaço do escarro tratada com DTT e (3) confecção de citospinas do escarro tratado com DTT. Apesar das primeiras duas técnicas reduzirem o tempo e custo da análise do escarro, o coeficiente de correlação de Spearman pode ser considerado inadequado para esse tipo de análise, e variou de $r = 0,57$ a $0,64$ para eosinófilos e $r = 0,51$ a $r = 0,57$ para neutrófilos ($p < 0,01$). O trabalho concluiu que a técnica que utiliza lâminas confeccionadas com citospinas de amostras tratadas com o DTT é a mais indicada para fins de pesquisa e em centros especializados (SARAIVA-ROMANHOLO *et al.*, 2003).

Um dos aspectos que previne o uso mais disseminado do escarro induzido é a complexidade e o tempo de processamento das amostras. Dois estudos anteriores tentaram reduzir a complexidade do processamento das amostras (PIZZICHINI, PIZZICHINI E HARGREAVE, 2004; CHABOILLEZ *et al.*, 2013), ambos usando o dispositivo Accufilter® porém sem redução dos custos. O Accufilter® seria uma alternativa para a padronização do processamento do escarro induzido e consiste em um kit com um tubo para a pesagem e tratamento do escarro induzido selecionado da saliva, acoplado a um filtro e um tubo receptor, além do DTT, solução salina e *trypan blue*. Um estudo publicado recentemente (CHABOILLEZ *et al.*, 2013), procurou determinar a validade do uso do dispositivo Accufilter® para a análise do escarro comparando-o com a metodologia tradicional. Os resultados do estudo geraram CCIs que indicam uma boa reprodutibilidade entre as metodologias para as contagens de eosinófilos e neutrófilos, entretanto, os índices apontaram diminuição na viabilidade celular, CCT e aumento no percentual de células epiteliais escamosas com a utilização do Accufilter®.

O presente estudo também nos permite avaliar a validade da contagem celular diferencial realizada em citospinas coradas pelos dois métodos uma vez que houveram diferenças significativas entre os três grupos estudados. Esses grupos foram representativos de asma, DPOC e indivíduos saudáveis tanto do ponto de características demográficas e funcionais (espirométricas), bem como do ponto de vista de celularidade no escarro induzido. Os resultados do presente estudo estão alinhados

com os inúmeros trabalhos anteriormente publicados demonstrando que o escarro dos pacientes portadores de asma é rico em eosinófilos (GIBSON *et al.*, 1989; PIZZICHINI *et al.*, 1996; HUNTER *et al.*, 2002; PAVORD *et al.*, 2002; DJUKANOVIC E STERK, 2004; HARGREAVE E PARAMESWARAN, 2006; JAYARAM *et al.*, 2006), o que contrasta com o escarro de pacientes portadores de DPOC, que é predominantemente neutrofílico (PAVORD *et al.*, 1997; PAVORD *et al.*, 2002; DJUKANOVIC E STERK, 2004; MENEZES *et al.*, 2005; O'DONNELL *et al.*, 2008; WHO, 2013). Além disso, em concordância com os valores normais da celularidade do escarro induzido já publicados (BELDA *et al.*, 2000; SPANEVELLO *et al.*, 2000; VERAS *et al.*, 2011), o grupo controle teve uma maior porcentagem de macrófagos em relação aos demais.

Em síntese, o elevado grau de concordância nas contagens celulares de citospinas coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa e com o corante hematológico rápido atesta a confiabilidade desta última coloração, o que justifica sua recomendação para o uso quando se pretende reduzir o tempo de processamento e os custos do exame do escarro induzido.

7 CONCLUSÕES

- i. A confiabilidade das contagens celulares intra-observador e entre observadores para os dois tipos de coloração foi excelente, de substancial a quase perfeita.
- ii. Os resultados demonstraram um elevado grau de concordância na detecção de escarro eosinofílico e de escarro neutrofílico entre observadores e intra-observador para os dois tipos de coloração.
- iii. Em conjunto, estes resultados demonstram a confiabilidade da coloração hematológica rápida o que justifica sua recomendação para o uso quando se pretende reduzir o tempo de processamento e os custos do exame do escarro induzido.

REFERÊNCIAS

- ALAM, R. et al. Development of a new technique for recovery of cytokines from inflammatory sites in situ. **J Immunol Methods**, v. 155, n. 1, p. 25-9, Oct 1992.
- ARAUJO, L. et al. Induced sputum in children: success determinants, safety, and cell profiles. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 216-21, 2011.
- ATS, American Thoracic Society. Standardization of spirometry: 1994 update. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 152, p. 1107-36, 1995.
- BELDA, J. et al. Induced sputum cell counts in healthy adults. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, n. 2 Pt 1, p. 475-8, Feb 2000.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. **Lancet**, v. 346, n. 8982, p. 1085-7, Oct 1995.
- BRIGHTLING, C. E. et al. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 2, p. 406-10, Aug 1999.
- BROWN, H. M. Treatment of chronic asthma with prednisolone; significance of eosinophils in the sputum. **Lancet**, v. 2, n. 7059, p. 1245-7, Dec 1958.
- CHABOILLET, S. et al. A kit to facilitate and standardize the processing of sputum for measurement of airway inflammation. **Can Respir J**, v. 20, n. 4, p. 248-52, Jul-Aug 2013.
- CHODOSH, S. Examination of sputum cells. **N Engl J Med**, v. 282, n. 15, p. 854-7, Apr 1970.
- CRAPO, R. O.; MORRIS, A. H.; GARDNER, R. M. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. **Am Rev Respir Dis**, v. 123, n. 6, p. 659-64, Jun 1981.

CREGAN, P. et al. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 11, p. 2432-6, Nov 1990.

DJUKANOVIC, R.; STERK, P. J. **An atlas of induced sputum : an aid for research and diagnosis**. Boca Raton ; London: Parthenon Pub. Group, 2004.

EFTHIMIADIS, A. et al. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. **Eur Respir J**, v. 10, n. 6, p. 1336-40, Jun 1997.

EFTHIMIADIS A, P. M., PIZZICHINI E ET AL. The influence of cell viability and squamous epithelial cell contamination on the repeatability of sputum differential cell counts (abstract). **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine.**, v. 151, n. A384, 1995.

EFTHIMIADIS, A. et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. **Eur Respir J Suppl**, v. 37, p. 19s-23s, Sep 2002.

GAUVREAU, G. M. et al. Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, n. 5, p. 1473-8, May 2000.

GIBSON, P. G. et al. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. **Thorax**, v. 44, n. 9, p. 693-9, Sep 1989.

HALDAR, P.; PAVORD, I. D. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. **J Allergy Clin Immunol**, v. 119, n. 5, p. 1043-52; quiz 1053-4, May 2007.

HARGREAVE, F. E.; PARAMESWARAN, K. Asthma, COPD and bronchitis are just components of airway disease. **Eur Respir J**, v. 28, n. 2, p. 264-7, Aug 2006.

HOROBIN, R. W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining

mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotech Histochem**, v. 86, n. 1, p. 36-51, Feb 2011.

HUNTER, C. J. et al. A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma. **Chest**, v. 121, n. 4, p. 1051-7, Apr 2002.

JATAKANON, A.; LIM, S.; BARNES, P. J. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, n. 1, p. 64-72, Jan 2000.

JAYARAM, L. et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. **Eur Respir J**, v. 27, n. 3, p. 483-94, Mar 2006.

JUNIPER, E. F. et al. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. **Eur Respir J**, v. 14, n. 4, p. 902-7, Oct 1999.

KELLOGG, J. A. et al. Diff-Quik stain as a simplified alternative to Papanicolaou stain for determination of quality of endocervical specimens submitted for PCR detection of *Chlamydia trachomatis*. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 10, p. 2590-2, Oct 1996.

KELLY, M. M. et al. Induced sputum: validity of fluid-phase IL-5 measurement. **J Allergy Clin Immunol**, v. 105, n. 6 Pt 1, p. 1162-8, Jun 2000.

KHARITONOV, S. A.; BARNES, P. J. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. **Biomarkers**, v. 7, n. 1, p. 1-32, Jan-Feb 2002.

KIPS, J. C. et al. A long-term study of the antiinflammatory effect of low-dose budesonide plus formoterol versus high-dose budesonide in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, n. 3 Pt 1, p. 996-1001, Mar 2000.

LABORCLIN. **Instruções de uso - Corante Panótico Rápido LB.**: Laborclín produtos para laboratórios Ltda. 2005. - BULA DE REAGENTE

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-74, Mar 1977.

LEIGH, T. R. et al. Sputum induction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Lancet**, v. 2, n. 8656, p. 205-6, Jul 1989.

LEMIERE, C. et al. Comparison of cellular composition of induced sputum analyzed with Wright staining and immunocytochemistry. **J Allergy Clin Immunol**, v. 108, n. 4, p. 521-3, Oct 2001.

MARSHALL, P. N.; BENTLEY, S. A.; LEWIS, S. M. An evaluation of some commercial Romanowsky stains. **J Clin Pathol**, v. 28, n. 8, p. 680-5, Aug 1975.

MELO, R. E.; POPOV, T. A.; SOLE, D. Exhaled breath temperature, a new biomarker in asthma control: a pilot study. **J Bras Pneumol**, v. 36, n. 6, p. 693-9, Nov-Dec 2010.

MENEZES, A. M. et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in Sao Paulo, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 5, p. 1565-73, Sep-Oct 2005.

MORITZ, P. et al. Determinação do componente inflamatório das doenças das vias aéreas através do escarro induzido: utilização na prática clínica. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 11, p. 913-921, Nov 2008.

O'DONNELL, D. E. et al. Canadian Thoracic Society recommendations for management of chronic obstructive pulmonary disease - 2008 update - highlights for primary care. **Can Respir J**, v. 15 Suppl A, p. 1A-8A, Jan-Feb 2008.

OPPENHEIMER, E. A. et al. Cytological examination of the sputum. **Lancet**, v. 2, n. 7524, p. 1001-2, Nov 1967.

PALOMBINI, B. C. et al. Exame Físico - Valorização do exame de escarro. In: **Condutas em Pneumologia**. Rio de Janeiro: Revinter, v.1, 2001. p.67-78.

PARAMESWARAN, K. et al. Lipid-laden macrophages in induced sputum are a marker of oropharyngeal reflux and possible gastric aspiration. **Eur Respir J**, v. 16, n. 6, p. 1119-22, Dec 2000.

PAVORD, I. D. et al. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. **Lancet**, v. 353, n. 9171, p. 2213-4, Jun 1999.

PAVORD, I. D. et al. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. **Thorax**, v. 52, n. 6, p. 498-501, Jun 1997.

PAVORD, I. D. et al. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. **Eur Respir J Suppl**, v. 37, p. 40s-43s, Sep 2002.

PIN, I. et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. **Thorax**, v. 47, n. 1, p. 25-9, Jan 1992.

PIZZICHINI, E. et al. **Sputum Examination for Indices of Airway Inflammation: Laboratory Procedures**. Lund, Sweden: Astra Draco AB, 1997.

PIZZICHINI, E. et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 154, n. 2 Pt 1, p. 308-17, Aug 1996.

PIZZICHINI, E. et al. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. **Eur Respir J**, v. 9, n. 6, p. 1174-80, Jun 1996.

PIZZICHINI, E.; PIZZICHINI, M. M.; HARGREAVE, F. E. Induced sputum (IS) cell counts: a new device to standardize processing in clinical trials and practice. In: International Conference of American Thoracic Society, 2004, Orlando. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, p. A817, 2004.

PIZZICHINI, E. et al. Safety of sputum induction. **Eur Respir J Suppl**, v. 37, p. 9s-18s, Sep 2002.

PIZZICHINI, M. M. et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 154, n. 4 Pt 1, p. 866-9, Oct 1996.

POPOV, T. A. et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. **Eur Respir J**, v. 8, n. 4, p. 559-65, Apr 1995.

ROY, S. et al. Abundance of siderophages in sputum: indicator of an adverse lung reaction to air pollution. **Acta Cytol**, v. 45, n. 6, p. 958-64, Nov-Dec 2001.

SARAIVA-ROMANHOLO, B. M. et al. Comparison of three methods for differential cell count in induced sputum. **Chest**, v. 124, n. 3, p. 1060-6, Sep 2003.

SILVA, L. C. C. D. Diagnóstico em Pneumologia. In: **Conduitas em Pneumologia**. Rio de Janeiro: Revinter, v.1, 2001. p.54-55.

SILVA, L. C. C. D.; HETZEL, J. L. Pneumonias obstrutivas. . In: **Conduitas em Pneumologia**. Rio de Janeiro: Revinter, v.1, 2001. p.261.

SMITH, A. D. et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 21, p. 2163-73, May 26 2005.

SPANEVERELLO, A. et al. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 162, n. 3 Pt 1, p. 1172-4, Sep 2000.

SPANEVERELLO, A. et al. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. **Clin Exp Allergy**, v. 27, n. 10, p. 1138-44, Oct 1997.

VERAS, T. N. et al. Cellular composition of induced sputum in healthy adults. **J Bras Pneumol**, v. 37, n. 3, p. 348-53, Jun 2011.

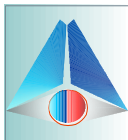
WALTER, S. D.; ELIASZIW, M.; DONNER, A. Sample size and optimal designs for reliability studies. **Stat Med**, v. 17, n. 1, p. 101-10, Jan 1998.

WARD, R. et al. Between-observer repeatability of sputum differential cell counts. Influence of cell viability and squamous cell contamination. **Clin Exp Allergy**, v. 29, n. 2, p. 248-52, Feb 1999.

WHO, World Health Organization. Global strategy for asthma management and prevention (UPDATED 2012): Global Initiative for Asthma (GINA). 2012. Disponível em : <<http://www.ginasthma.org>>.

WHO, World Health Organization. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (UPDATED 2013): Global Initiative for Chronic Pulmonary Obstructive Disease (GOLD). 2013. Disponível em: < www.goldcopd.org >.

APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: “Validação da coloração hematológica rápida para citologia de escarro”

INTRODUÇÃO:

Os pronomes “você” e “seu” referem-se ao participante do estudo em todo este formulário de consentimento. O objetivo deste formulário é dar a você informações sobre esta pesquisa. Você pode se recusar a participar ou pode sair do estudo a qualquer momento sem qualquer penalidade. Assinando este formulário, você concorda em participar do estudo.

OBJETIVO DESTE ESTUDO:

Você foi convidado a participar deste estudo por ter asma, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica ou ausência de sintomas ou outras doenças do trato respiratório. O objetivo deste estudo é diminuir o tempo de análise do exame do escarro, permitindo que o resultado deste exame seja obtido mais rapidamente, minimizando o custo do exame e beneficiando pacientes que possuem doença respiratória.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO:

Este é um estudo que envolverá cerca de 50 pessoas com idade superior a 18 anos. A sua participação no estudo consistirá em uma visita ao Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas (NUPAIVA) do Hospital Universitário. Nesta ocasião serão realizados: um questionário sobre dados preliminares como nome, idade, doença e uso de medicamentos, um exame de espirometria e de escarro induzido.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:

Os seguintes procedimentos serão conduzidos durante sua visita ao NUPAIVA:

- Será pedido que você leia e assine este formulário de consentimento informado antes de serem realizados quaisquer questionários, testes ou procedimentos.
- Revisão das suas condições médicas atuais e passadas e uso de medicamentos.
- Espirometria: teste respiratório que requer que você respire em um tubo ligado a uma máquina que mede o funcionamento dos seus pulmões.
- Indução e coleta de escarro: realizada através de inalação de soro fisiológico para obtenção de uma amostra de escarro a qual refletirá as condições do seu pulmão.

RISCOS E DESCONFORTOS:

Os testes aos quais você será submetido são procedimentos padronizados e utilizados corriqueiramente na prática médica, e em geral se associam com riscos insignificantes.

A espirometria é um exame bem tolerado, podendo ocasionar em algumas pessoas certa tontura que cessa com uma interrupção breve do procedimento. Os procedimentos de espirometria, indução e coleta de escarro serão realizados com acompanhamento de uma enfermeira que esclarecerá todas as suas dúvidas, e o(a) ajudará durante o procedimento.

Para a realização do questionário clínico e dos testes acima será necessário que você permaneça no centro do estudo por um período total de uma hora. Após a realização dos testes você poderá exercer suas atividades rotineiras normalmente, sem nenhuma restrição.

CONFIDENCIALIDADE

Sua identidade, incluindo seu nome completo e as informações obtidas sobre você durante este estudo permanecerão confidenciais até onde possível por lei. No entanto, o médico do estudo e outros médicos ligados ao centro do estudo poderão revisar seus registros médicos e o formulário de consentimento. Os resultados deste estudo podem ser publicados em jornais científicos ou apresentados em encontros médicos, mas você não será identificado pelo nome.

ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade. Se você decidir participar, você deverá primeiramente assinar este Termo de Consentimento Informado

declarando seu acordo em participar espontaneamente, e confirmando que você leu e entendeu todas as informações fornecidas neste termo. É garantida a sua liberdade de se retirar deste estudo a qualquer hora que você desejar, sem causar nenhum prejuízo à continuidade do seu tratamento nesta instituição.

CONTATOS

Os pesquisadores envolvidos neste estudo responderão quaisquer perguntas que você tiver sobre o mesmo. Entre em contato sempre que tiver qualquer dúvida sobre o estudo ou sua participação no mesmo.

MÉDICOS DO ESTUDO: Dr. Emilio Pizzichini / Dr. Márcia M. M. Pizzichini

OUTROS PROFISSIONAIS DO ESTUDO: além destes médicos, nosso grupo de pesquisa conta ainda com três enfermeiras e uma farmacêutica bioquímica.

TELEFONE: (48) 3234-7711 - NUPAIVA - Hospital Universitário

Se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisas (CEP)

Cidade Universitária - Trindade Florianópolis / SC CEP: 88040 - 900
Telefone: 3234-1755

Muito obrigada pela atenção,

Jéssica Gonçalves
Pesquisadora Principal

Prof. Dr. Emílio Pizzichini
Orientador

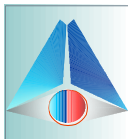
Eu, _____, fui esclarecido sobre a pesquisa “Validação da coloração hematológica rápida para citologia de escarro”, e concordo que meus dados e amostra sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, ____ de _____ de 20__.

Assinatura: _____

RG: _____.

APÊNDICE II – Elegibilidade Asma



NUPAIVA
 Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas
 Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Pneumologia
 Hospital Universitário – UFSC. Tel.: 48-32347711

GRUPO ASMA:

Número:

Registro HU:

Nome:

Idade:

Sexo: Masculino Feminino

Município:

Telefone de contato:

SIM NÃO

Tem diagnóstico de asma definida por critério objetivo: limitação reversível ao fluxo de ar ($VEF_1 > 12\%$ e superior a 200ml após inalação de broncodilatador de curta duração) ou hiperresponsividade das vias aéreas à metacolina ($PC_{20} < 8\text{mg/ml}$) quando de um $VEF_1 > 70\%$ do previsto?

Tem escore do ACQ maior que 2.0?

Nunca fumou ou deixou de fumar a mais de 1 ano (carga menor que 10 maços por ano) ?

Livre de infecção das vias aéreas superiores no último mês?

É capaz de produzir escarro induzido?

É capaz de fornecer consentimento informado antes do estudo?

É gestante?

Têm outras doenças pulmonares conhecidas?

Têm doenças graves de outros sistemas?

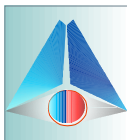
Faz uso de algum outro medicamento?

Qual? _____

Data: _____

Pesquisador:

APÊNDICE III – Elegibilidade DPOC



NUPAIVA
 Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas
 Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Pneumologia
 Hospital Universitário – UFSC. Tel.: 48-32347711

GRUPO DPOC:

Número:

Registro HU:

Nome:

Idade:

Sexo: Masculino Feminino

Município:

Telefone de contato:

SIM **NÃO**

Tem sintomas respiratórios associados à obstrução moderada ou grave ao fluxo de ar ($VEF_1 < 50\%$ do previsto como um $VEF_1/CVF < 0.7$) das vias aéreas?

Tem história de tabagismo importante (carga > 20 maços/ano)?

Livre de infecção das vias aéreas superiores no último mês?

É capaz de produzir escarro induzido?

É capaz de fornecer consentimento informado antes do estudo?

É gestante?

Têm outras doenças pulmonares conhecidas?

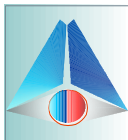
Têm doenças graves de outros sistemas?

Faz uso de algum outro medicamento? Qual?

Data:

Pesquisador:

APÊNDICE IV – Elegibilidade Controle



NUPAIVA
 Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas
 Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Pneumologia
 Hospital Universitário – UFSC. Tel.: 48-32347711

GRUPO NORMAL:

Número:

Registro HU:

Nome:

Idade:

Sexo: Masculino Feminino

Município:

Telefone de contato:

SIM **NÃO]**

Tem ausência de sintomas respiratórios?

Têm espirometria e responsividade à metacolina normais?

Livre de diagnóstico de alguma doença respiratória?

É não fumante ou deixou de fumar (< 5 maços por ano)?

Livre de uso de medicação sistêmica?

Livre de infecção respiratória no último mês?

É capaz de produzir escarro induzido?

É capaz de fornecer consentimento informado antes do estudo?

É gestante?

Têm outras doenças pulmonares conhecidas?

Têm doenças graves de outros sistemas?

Faz uso de algum outro medicamento?

Qual? _____

Data:

Pesquisador:

ANEXO I – Certificado Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Certificado

Page 1 of 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 2093

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584 GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2093 FR: 437236

TÍTULO: Validação da coloração hematológica rápida para citologia de escarro

AUTOR: EMILIO PIZZICHINI, Jessica Gonçalves

FLORIANÓPOLIS, 28 de Novembro de 2011.

Coordenador do CEPSH/UFSC

Prof. Washington Portela de Souza
Universidade do CEP, PPS, UFSC

ANEXO II – Questionário De Controle De Asma – Acq7

Em média, durante os últimos sete dias, o quão frequentemente você acordou por causa de sua asma, durante a noite?

0 Nunca
 1 Quase nunca
 2 Poucas vezes
 3 Várias vezes
 4 Muitas vezes
 5 Muitíssimas vezes
 6 Incapaz de dormir devido à asma

Em média, durante os últimos sete dias, o quão ruins foram os seus sintomas de asma, quando você acordou pela manhã?

0 Sem sintomas
 1 Sintomas muito leves
 2 Sintomas leves
 3 Sintomas moderados
 4 Sintomas um tanto graves
 5 Sintomas graves
 6 Sintomas muito graves

De um modo geral, durante os últimos sete dias, o quão limitado você tem estado em suas atividade por causa de sua asma?

0 Nada limitado
 1 Muito pouco limitado
 2 Pouco limitado
 3 Moderadamente limitado
 4 Muito limitado
 5 Extremamente limitado
 6 Totalmente limitado

De um modo geral, durante os últimos sete dias, o quanto de falta de ar você teve por causa de sua asma?

0 Nenhuma
 1 Muito pouca
 2 Alguma
 3 Moderada
 4 Bastante
 5 Muita
 6 Muitíssima

De um modo geral, durante os últimos sete dias, quanto tempo você teve chiado?

0 Nunca
 1 Quase nunca
 2 Pouco tempo
 3 Algum tempo

- Bastante tempo
 Quase sempre
 Sempre

Em média, durante os últimos sete dias, quantos jatos de broncodilatador de resgate (salbutamol, fenoterol, etc.) você usou por dia?

- Nenhum
 1-2 jatos na maior parte dos dias
 3-4 jatos na maior parte dos dias
 5-8 jatos na maior parte dos dias
 9-12 jatos na maior parte dos dias
 13-16 jatos na maior parte dos dias
 Mais de 16 jatos na maior parte dos dias

Para ser preenchido pela equipe clínica

VEF₁ pré broncodilatador: ___L

4. VEF₁ previsto: ___L

% VEF₁ previsto

- >95% previsto
 95-90% previsto
 89-80% previsto
 79-70% previsto
 69-60% previsto
 59-50% previsto
 <50% previsto