



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

**CORRELAÇÃO ENTRE MEDIDAS DE  
INTERLEUCINAS DO FLUIDO NASAL E DO  
ESCARRO INDUZIDO OBTIDAS POR MATRIZ  
SINTÉTICA ABSORTIVA**

**DOUTORADO**

**José Tavares de Melo Júnior**

**Florianópolis  
2017**

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

José Tavares de Melo Júnior

**CORRELAÇÃO ENTRE MEDIDAS DE INTERLEUCINAS DO  
FLUIDO NASAL E DO ESCARRO INDUZIDO OBTIDAS POR  
MATRIZ SINTÉTICA ABSORTIVA**

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Emílio Pizzichini.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Margareth Menezes Pizzichini.

Área de Concentração: Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese e resposta terapêutica da inflamação das vias aéreas.

Florianópolis  
2017

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

Melo Junior, José Tavares de  
Correlação entre medidas de interleucinas do  
fluido nasal e do escarro induzido obtidas por  
matriz sintética absorviva / José Tavares de Melo  
Junior ; orientador, Emilio Pizzichini;  
coorientadora, Márcia Margareth Menezes Pizzichini  
SC, 2017.  
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis,  
2017.

Inclui referências.


1. Ciências Médicas-Novo. 2. Asma. 3. Inflamação  
de vias aéreas. 4. Citocinas. I. Pizzichini,  
Emilio. II. Menezes Pizzichini, Márcia Margareth.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo.  
IV. Título.

**JOSÉ TAVARES DE MELO JÚNIOR**  
**“CORRELAÇÃO ENTRE MEDIDAS DE INTERLEUCINAS DO FLUIDO  
NASAL E DO ESCARRO INDUZIDO OBTIDAS POR MATRIZ  
SINTÉTICA ABSORTIVA”**

Esta tese foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

**DOCTOR EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

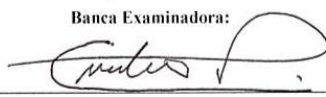
E aprovada em 23 de fevereiro de 2017, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Área de Concentração: **Investigação Biomédica.**



---

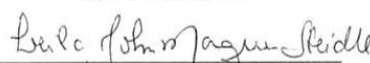
**Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre**  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:




---

**Prof. Dr. Emilio Pizzichini**  
Presidente/Orientador



---

**Prof. Dr. Lélia John Marques Steidle**  
Membro



---

**Prof. Dr. Jane de Silva**  
Membro



---

**Prof. Dr. Nazaré Otilia Nazário**  
Membro



---

**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol**  
Membro



---

**Prof. Dr. Darlan Laurindo Matte**  
Membro

Florianópolis, 2017



Aos meus pais, Haydée e José, pelo norte. À minha esposa, Nastaja, pelo calor. Aos meus filhos, Davi e Arthur, pela continuidade.



## RESUMO

**Introdução:** a asma é uma doença inflamatória das vias aéreas complexa e heterogênea. O conhecimento dos diferentes perfis inflamatórios é necessário para a identificação de possíveis endótipos. A partir do conceito de vias aéreas unidas é plausível que as medidas do processo inflamatório das vias aéreas inferiores possam ser avaliadas a partir de espécimes das vias aéreas superiores obtidos por meio de uma matriz sintética absorviva

**Objetivos:** investigar a exequibilidade, a correlação e o poder discriminativo das medidas de um painel de interleucinas do fluido nasal e do escarro induzido obtidas por meio de uma matriz sintética absorviva.

**Métodos:** estudo transversal que avaliou asmáticos sem uso de corticóide inalatório ou oral (n=32) e indivíduos normais (n=21). Espécimes do fluido nasal e do escarro induzido obtidos por meio de uma matriz sintética absorviva foram processados e analisados em uma plataforma multiplex. As medidas de um painel de interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , Eotaxina-1, IP-10 e TNF- $\alpha$ ) do fluido nasal foram comparadas ao painel de interleucinas do escarro induzido. A contagem diferencial de células do escarro induzido foi também determinada para avaliar o padrão inflamatório das vias aéreas.

**Resultados:** o método de coleta por matriz sintética absorviva foi exequível em mensurar as interleucinas do fluido nasal e do escarro induzido de indivíduos asmáticos e normais sem estímulo provocatório prévio. Houve correlações positivas entre as medidas do fluido nasal e escarro induzido para as interleucinas IL-5 (r 0,6; p valor < 0,001), IL-10 (r 0,5; p valor < 0,001), IP-10 (r 0,6; p valor < 0,001), IFN- $\gamma$  (r 0,6; p valor < 0,001) e TNF- $\alpha$  (r 0,4; p valor 0,002), e correlações positivas entre a contagem de eosinófilos do escarro e a IL-5 nasal (r 0,7; p valor < 0,001). A análise de componentes principais identificou 2 padrões inflamatórios distintos, um com citocinas padrão Th1/Th17 e outro com citocinas predominantemente Th2. A análise de regressão multivariada logística permitiu identificar a IL-5 e IL-8 do fluido nasal como preditoras do escarro eosinofílico.

**Conclusão:** o método de coleta por matriz sintética absorviva foi exequível e permitiu detectar as correlações entre o perfil inflamatório do fluido nasal e do escarro induzido, bem como discriminar grupos de indivíduos com perfis inflamatórios distintos.

**Palavras chave:** secreções nasais; citocinas; escarro induzido; biomarcadores; inflamação de vias aéreas; asma.





## ABSTRACT

**Introduction:** asthma is a complex and heterogeneous inflammatory disease of the airways. Assessment of different inflammatory patterns is necessary for the identification of endotypes of the disease. According to the united airways concept it is plausible that the measurements of the inflammatory process of the lower airways can be studied in specimens of the upper airways sampled by means of a synthetic absorptive matrix

**Objectives:** to investigate the feasibility, correlation and discriminative properties of a method of sampling nasal lining fluid and induced sputum using a synthetic absorptive matrix for the measurement of a panel of interleukins

**Methods:** this cross-sectional study evaluated steroid naive asthmatics (n = 32) and normal subjects (n = 21). Specimens of the nasal fluid obtained by a synthetic absorptive matrix and induced sputum were processed and analyzed in a multiplex platform. A panel of nasal interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , Eotaxin-1, IP-10 and TNF- $\alpha$ ) was compared to the panel of induced sputum interleukins. Sputum differential cell count was also determined to assess the inflammatory profile of the airways.

**Results:** the synthetic absorptive matrix sampling method was feasible to measure nasal lining fluid and induced sputum interleukins of asthmatic and normal individuals without previous challenge. We found positive correlations between nasal and sputum interleukins, such as IL-5 (R 0.6, p value <0.001), IL-10 (r 0.5, p value <0.001), IP-10 (r 0.6, p value <0.001), IFN- $\gamma$  (r 0.6; p value < 0,001) and TNF- $\alpha$  (r 0.4, p value 0.002), and positive correlations between sputum eosinophil counts and nasal IL-5 (r 0.7; p value <0.001). Principal component analysis identified two major components; one Th1 / Th17 driven and the other mostly driven by Th2 interleukins. Logistic regression analysis allowed the identification of two predictors of eosinophilic sputum; IL-5 and IL-8.

**Conclusion:** the method of sampling specimens of the nasal lining fluid and induced sputum by means of a SAM for the measurement of interleukins was feasible, allowed to detect positive correlations between the inflammatory profile of the nasal fluid and induced sputum, as well as discriminated groups of individuals with different inflammatory patterns.

**Keywords:** nasal secretions; cytokines; induced sputum; biomarkers; airways inflammation; asthma



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inserção da matriz sintética absorviva na cavidade nasal.....	47
Figura 2 - Concentrações de IL-5 do fluido nasal e IL-5 do escarro induzido em normais e asmáticos. Valores de IL-5 expressos em Log para composição gráfica; * p valor < 0,001; ** p valor 0,001.....	55
Figura 3 - Análise de componentes principais (PCA) para as interleucinas do fluido nasal em todos os participantes (asmáticos e normais). Após extração em 2 fatores e remoção de variáveis com baixa comunalidade (IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$ ), as variáveis em vermelho — TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ e IL-17 — são melhor explicadas pelo componente principal 1. As variáveis em azul — IL-5, Eotaxina e IP-10 — são melhor explicadas pelo componente principal 2.....	56



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos sujeitos.....	51
Tabela 2 -Resultados fora do espectro de quantificação .....	52
Tabela 3 - Valores mensurados de interleucinas do fluido nasal e escarro induzido .....	52
Tabela 4 - Contagem diferencial de células do escarro induzido .....	53
Tabela 5 - Análise da concordância entre as medidas em duplicata.....	53
Tabela 6 - Correlação entre medidas de interleucinas do fluido nasal e do escarro induzido em asmáticos e normais .....	54
Tabela 7 - Correlação entre contagem de eosinófilos do escarro induzido e interleucinas do fluido nasal .....	54



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostras de Domicílios
IC	Intervalo de confiança
PC20	Concentração provocativa necessária para produzir uma queda de 20% no VEF1
Th	Linfócito T <i>helper</i>
IL	Interleucina
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
CD	<i>Cluster designation</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
DREA	Doença respiratória exacerbada por anti-inflamatórios não esteroidais
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i>
MSA	Matriz sintética absorviva
VEF1	Volume expiratório forçado 1º segundo
CVF	Capacidade vital forçada
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
DPP	<i>Dipeptidyl peptidase</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
ICC	<i>Intraclass correlation coefficient</i>





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 A importância da asma .....	19
1.2 Definição de asma .....	20
1.3 O conceito de vias aéreas unidas .....	20
1.3.1 Aspectos epidemiológicos .....	21
1.3.2 Características anatômicas .....	22
1.3.3 Complementaridade fisiológica .....	22
1.3.4 Estudos de intervenções e aspectos terapêuticos .....	22
1.3.5 Características anatomopatológicas.....	24
1.4 Fenótipos da asma .....	25
1.4.1 Asma alérgica .....	25
1.4.2 Asma não alérgica .....	26
1.4.3 Asma não eosinofílica .....	27
1.4.4 Asma relacionada à intolerância a aspirina .....	27
1.5 Endótipos da asma.....	288
1.6 Endótipos nas rinites e rinossinusites .....	29
1.7 Métodos de avaliação da inflamação das vias aéreas .....	30
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	37
3.1 Hipótese nula.....	37
3.2 Hipótese alternativa.....	37
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	39
4.1 Objetivo geral.....	39
4.2 Objetivos específicos.....	39
<b>5 MÉTODOS</b> .....	41
5.1 Delineamento do estudo .....	41
5.2 Amostra .....	41
5.3 Participantes .....	41
5.3.1 Asmáticos sem uso de tratamento controlador .....	42
5.3.2 Normais .....	42
5.3.3 Critérios de Exclusão.....	43
5.4 Aspectos éticos .....	43
5.5 Coleta de dados .....	43
5.5.1 Visita 1 .....	43
5.5.2 Visita 2 (aproximadamente após 1 semana) .....	44
5.5.3 Métodos Complementares .....	45
5.5.4 Materiais e equipamentos necessários .....	47
5.6 Medidas .....	48

5.6.1 Desfecho principal.....	48
5.6.2 Eventos medidos no escarro .....	48
5.7 Análise estatística .....	48
<b>6 RESULTADOS</b> .....	51
6.1 Características dos participantes.....	51
6.2 Biomarcadores.....	51
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>9 IMPLICAÇÕES</b> .....	65
<b>10 REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>11 APÊNDICES</b> .....	79
11.1 Apêndice A – Artigo original .....	79
11.2 Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91
<b>12 ANEXO</b> .....	96
12.1 Anexo A – Aprovação pelo Comitê de Ética .....	96

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A importância da asma

A asma figura entre as principais doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas e, apesar do progresso terapêutico, continua significativa a morbidade, a repercussão na qualidade de vida, bem como a mortalidade associadas a impacto financeiro elevado. [1]

A asma afeta mundialmente mais de 300 milhões de pessoas, [2] com taxas de prevalência em adultos variando de 0,2 a 21%. [3] Evidências demonstram que existe uma tendência à redução da prevalência dos sintomas da asma na Europa ocidental, enquanto aumenta em locais onde previamente a prevalência era baixa, notadamente em países da África, América Latina, Europa Oriental e Ásia. [4] No Brasil, os dados do estudo ISAAC (acrônimo em inglês para “Estudo Internacional para Asma e Alergias na Infância”) revelaram que a prevalência de asma foi de 19% em adolescentes e de 24,3% em crianças. [5] Quando essas prevalências foram comparadas com as da primeira fase do mesmo estudo, conduzido sete anos antes, houve uma tendência à redução das mesmas. Mesmo assim, a prevalência da doença no Brasil, para esta faixa etária, ainda é uma das mais altas da América Latina. [6] Quanto aos adultos, estudos de base populacional conduzidos ao longo de quase duas décadas têm demonstrado uma estabilidade da prevalência do diagnóstico da doença no Brasil. Por exemplo, a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), realizada em três épocas — 1998, 2003 e 2008 —, em adultos  $\geq$  20 anos, mostrou prevalência de diagnóstico de asma de 4,1% em 1998 e 2003, e 4,0% em 2008. [7] Posteriormente, estudo com dados da Pesquisa Nacional em Saúde (PNS), envolvendo 60.202 participantes e abrangendo diversas regiões do país, cujo desfecho principal era o diagnóstico de asma em adultos com idade superior a 18 anos, aferido pela pergunta “algum médico já lhe deu o diagnóstico de asma (ou bronquite asmática)?”, revelou que a prevalência do autorrelato da doença nessa população foi 4,4% (IC 95% 4,1 — 4,7). [8]

O impacto financeiro, quer seja por meio de custos diretos (internações hospitalares, consultas médicas, medicamentos, dentre outros) como de indiretos (absenteísmo escolar e no trabalho, presentismo, dentre outros), é de enorme magnitude em diversos países, sendo as exacerbações as maiores determinantes do custo direto da asma. [9] Desta forma, o estudo do impacto financeiro em pacientes

com asma não controlada demonstra que melhorar a aderência a terapias baseadas em evidência se traduz em um significativo retorno no investimento. [10] No Brasil, dados do sistema público de saúde mostraram uma média anual de gastos entre 135 e 733 dólares por paciente em virtude de asma grave. [11]

## **1.2 Definição de asma**

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas inferiores e que se expressa clinicamente pela ocorrência de episódios intermitentes de dispneia, principalmente noturna, opressão torácica e tosse associada ou não à presença de sibilos expiratórios. Estes sinais e sintomas, que podem variar no tempo e em intensidade, decorrem de sua principal característica fisiopatológica, que é a limitação reversível ao fluxo de ar das vias aéreas inferiores pelo aumento anormal da responsividade destas vias a diversos estímulos. [1]

## **1.3 O conceito de vias aéreas unidas**

As vias aéreas superiores e inferiores são parte integrante do trato respiratório [12, 13] e encontram-se relacionadas por diversos fatores, incluindo os epidemiológicos, os anatômicos, os fisiológicos, os imunopatológicos e os farmacológicos. [14, 15] Por isso, as vias aéreas superiores e inferiores podem ser consideradas uma unidade morfológica e funcional, originando, a partir desta aceção, o conceito de vias aéreas unidas (ou via aérea única). [16]

Sobretudo, o conceito de vias aéreas unidas tem sido fundamentado na estreita relação entre a rinite e a asma, que poderiam ser consideradas como manifestações de uma mesma doença. [15, 17] Quatro são os mecanismos postulados para tentar elucidar a conexão entre as duas doenças. [18] Primeiro, uma vez inflamada a mucosa nasal, sobrevém o edema. Com isso, a respiração torna-se bucal e, como consequência, perda ou redução do mecanismo condicionador e protetor nasal do ar respirado. O segundo diz respeito a um possível reflexo nasobrônquico, onde a liberação de mediadores, como a histamina, estimula a via aérea inferior por meio de um reflexo neuronal nasal aferente e nervo vago eferente, resultando em hiperresponsividade brônquica. Terceiro, o conteúdo inflamatório produzido durante as crises de rinite drenam posteriormente (rinorreia posterior) e poderiam ser aspiradas para a via aérea inferior. Por último, a inflamação nasal local resulta em liberação de diversos mediadores para a corrente

sanguínea o que poderia resultar em broncoconstricção das vias aéreas inferiores. [18] Alternativamente, pode-se ainda fundamentar a relação entre a asma e a rinite sobre dois pressupostos. [19] Primeiro, tendo em vista que os mecanismos fisiopatológicos dessas doenças parecem ser similares e, também, que existe uma continuidade anatômica do epitélio respiratório presente desde as porções iniciais das nasais até os bronquíolos distais, quando um processo inflamatório afeta uma das unidades, o mesmo processo pode ser estimulado em outra unidade anatômica. A segunda premissa observa que, à medida que a gravidade da doença varia, tanto a via aérea superior quanto a inferior são igualmente acometidas. Em vista disso, quando um tratamento para a via aérea superior é instituído, espera-se melhora dos sintomas da via aérea inferior e vice-versa. [19]

### **1.3.1 Aspectos epidemiológicos**

Considerando a forte relação de prevalência entre a rinite e a asma, não é surpreendente que grande parte dos estudos sobre vias aéreas unidas explore precisamente esta conexão. É sabido que a maioria dos asmáticos tem rinite, pois, embora haja grande amplitude nos dados, em estudos bem conduzidos a prevalência de rinite em pacientes portadores de asma ultrapassa 80%. [16] Os dados epidemiológicos apontam entre 10% e 40% a prevalência da asma em pacientes portadores de rinosinusite. [20-23] Linneberg e colaboradores, em 2002, [21] ao conduzirem um estudo de base populacional no qual os sujeitos foram examinados em duas ocasiões em um intervalo de oito anos, constataram que todos os pacientes (n=52) com asma, sensíveis ao pólen, também exibiam sintomas de rinite alérgica quando estimulados por este mesmo alérgeno.

A rinite antecede as manifestações da asma na maioria dos casos e, pacientes com rinite, estão sob risco três vezes maior de desenvolver asma no futuro. [24] Assim, a rinite é considerada como fator de risco independente para a asma, mesmo na ausência de atopia, [25-27] além de ser fator de risco para o controle da asma. Adultos e crianças com rinite e asma concomitantemente são submetidos a um maior número de hospitalizações relacionadas à asma, apresentam maior número de visitas ao médico generalista, bem como despendem maior gasto em tratamentos quando comparados àqueles que possuem asma sem rinite. [28-31]

### **1.3.2 Características anatômicas**

A mucosa nasal e a brônquica apresentam muitas similaridades, sendo ambas compostas por um mesmo epitélio, predominantemente ciliado pseudoestratificado com células colunares, globosas e basais e uma submucosa que exibe vasos sanguíneos, glândulas mucosas e nervos. As diferenças mais marcantes entre as duas vias aéreas residem na ausência de musculatura lisa na submucosa do nariz, porém abundante nas vias aéreas inferiores e a presença de rico suprimento de capilares subepiteliais, sistemas arteriais e sinusóides venosos, peculiares da mucosa nasal. [32]

### **1.3.3 Complementaridade fisiológica**

Um dos conceitos mais importantes relativo à interação nariz – pulmão reside em sua complementaridade funcional, pois o nariz é capaz de umidificar e aquecer o ar inspirado, de maneira que ao chegar aos pulmões esteja condicionado a uma boa troca gasosa. [33, 34] É demonstrado, inclusive, que essa característica possa ser amplificada frente à estimulação do nariz com mecanismos provocadores inespecíficos, como o frio e o ar seco. [35] No que concerne a capacidade protetora, a cavidade nasal é, habitualmente, o primeiro local de interação entre os antígenos ambientais e a mucosa da via aérea e, precisamente, onde se estabelecem as linhas de defesa inata e adquirida. [36] Ao longo de sua superfície, o epitélio respiratório é recoberto por uma camada de muco. Esse muco, essencial no papel de defesa e limpeza das vias aéreas, está disposto em duas camadas com densidades distintas: uma mais superficial denominada gel e outra mais profunda denominada periciliar. [37] A camada gel, presente tanto na via aérea superior [38] como na via aérea inferior, [39] é composta predominantemente por mucinas capazes de interagir com IgA, colectinas e defensinas, além de exibirem propriedades antiadesivas, antimicrobianas e anti-inflamatórias. A harmonia entre o sistema mucoso e os batimentos ciliares proporciona a captura de partículas agressoras e a limpeza das vias aéreas. [36, 37]

### **1.3.4 Estudos de intervenções e aspectos terapêuticos**

O conceito de alergia como doença sistêmica fortalece a relação bidirecional entre as inflamações brônquica e nasal. Em pacientes com

doenças alérgicas, a provocação específica ativa uma resposta sistêmica que deflagra a produção de células inflamatórias pela medula. [40-44] Além disso, uma broncoprovocação segmentar pode acarretar sintomas e reduzir as funções tanto no nariz como nos pulmões, [40, 41] da mesma forma que a provocação nasal pode estimular a responsividade brônquica bem como aumentar a contagem de eosinófilos no escarro desses pacientes. [42]

Estudos com intervenções terapêuticas também reforçam o conceito de vias aéreas unidas. Embora seja ainda incerto que o tratamento a longo prazo da rinite possa reduzir o risco futuro de surgimento da asma, alguns estudos têm demonstrado um efeito positivo dos glicocorticóides intranasais em diminuir a hiperresponsividade brônquica à metacolina, [45-47] à histamina, [48, 49] e ao exercício; [50] enquanto outros relatam a ausência dos efeitos dessas medicações na hiperresponsividade brônquica à metacolina. [51, 52] Um estudo de meta-análise demonstrou o benefício na PC20 de 0,43 (95% IC, 0,16 — 0,69) a favor de qualquer forma de glicocorticoide intranasal. [53]

Estudos que observaram desfechos relacionados à melhoria clínica da asma indicaram, da mesma forma, benefícios advindos do tratamento da rinite. Em estudo de coorte histórica, foram examinadas taxas de internação e visita hospitalar relacionadas à asma em 4944 pacientes com rinite alérgica e asma. Destes, 3587 pacientes foram tratados para rinite alérgica, enquanto 1357 não fizeram tratamento para rinite. As hospitalizações relacionadas à asma reduziram em 61%, e a incidência de duas ou mais visitas a pronto atendimentos diminuíram em 54%. [54] Um estudo caso-controle, que incluiu 361 casos pareados com 1444 controles, concluiu que o tratamento da rinite com corticóides intranasais em pacientes asmáticos mostrou-se capaz de reduzir, além do gasto financeiro, o risco de visitas em pronto-socorro e internações por asma. [55] A cirurgia endoscópica funcional das cavidades paranasais, que almeja o alívio dos sintomas nasossinusais provavelmente por desobstruir óstios de drenagem paranasais, limpar secreções espessas e pólipos [56] e, sobretudo, por possibilitar uma anatomia ideal para a instilação de terapias tópicas, [57] também exerce efeitos sobre a via aérea inferior. Nos pacientes asmáticos, este procedimento pode melhorar os sintomas brônquicos e é capaz de reduzir o uso de medicação para a asma. [58, 59] Senior e colaboradores [60] acompanharam ao longo de 6,5 anos um grupo de 120 pacientes submetidos à cirurgia endoscópica das cavidades paranasais. Dos 30 pacientes asmáticos, observou-se que 90% (n=27) relataram que a doença estava melhor do que antes da cirurgia, além de ter havido



diminuição das exacerbações da asma e menor demanda por uso de medicamentos. Porém, informações como essas devem ser apreciadas com cautela, tendo em vista que limitações metodológicas, tais como dificuldades no cegamento de participantes e investigadores, e a aceitação dos pacientes em serem submetidos a intervenções cirúrgicas, podem comprometer desfechos de ensaios clínicos que envolvam procedimentos cirúrgicos. [61] Feita esta ressalva, resultados de um estudo prospectivo e randomizado demonstraram que o tratamento da rinossinusite crônica, tanto o medicamentoso como o cirúrgico, pode trazer benefícios à asma. [62]

### **1.3.5 Características anatomopatológicas**

Um aspecto anatomopatológico importante na asma diz respeito ao componente irreversível da obstrução da via aérea e resultado de alterações estruturais dos brônquios, denominado remodelamento. Este fenômeno é um processo dinâmico de deposição e degradação de matriz extracelular, caracterizado por fibrose subepitelial, aumento da musculatura lisa, hiperplasia de glândulas mucosas e células globosas e aumento da vascularização. Essas alterações histológicas têm sido associadas a consequências clínicas relevantes na asma, como o aumento da hiperresponsividade não específica da via aérea e a limitação minimamente reversível do fluxo aéreo, ambas capazes de influenciar na exacerbação da doença. Tem sido postulado que o remodelamento, tanto quanto a asma, é o resultado da inflamação da via aérea. [63-65]

Mesmo havendo diferenças anatômicas que diferem a via aérea inferior da superior, notadamente a ausência do arcaçouço muscular nesta última, diversos estudos, com resultados conflitantes, têm procurado apontar sinais de remodelamento na via aérea superior, incluindo espessamento da lâmina reticular, hiperplasia e hipertrofia de glândulas submucosas e células globosas, marcadores de ativação fibroblástica, níveis de proteínas de colágeno e metaloproteínases, bem como aumento da vascularização local. [66] Assim, o remodelamento pode cursar com alterações discretas do epitélio nasal [67] bem como o aumento da membrana basal e fibrose subepitelial. [68] Em estudo de Braunstahl e colaboradores foi demonstrado o aumento da espessura da membrana basal e descamação do epitélio na mucosa dos brônquios de pacientes com rinite alérgica e sem asma, novamente sugerindo uma conexão entre as doenças. [69] Entretanto, estudo mais recente falhou em detectar sinais de remodelamento da via aérea superior em pacientes

com rinite alérgica persistente quando comparados a participantes normais. [70] Esse resultado adicionou forte evidência a esse assunto, uma vez que, pelo menos no que concerne as estruturas celulares e moleculares estudadas, o conceito de remodelamento da via aérea superior não está presente na rinite alérgica. As discrepâncias desses resultados podem estar relacionadas, em parte, a questões metodológicas de estudos anteriores, por exemplo, os aspectos subjetivos da avaliação histológica.[65]

## **1.4 Fenótipos da asma**

Uma grande incógnita, motivo de profundo debate, é se a asma refere-se a uma única doença com apresentação variável ou se representa várias enfermidades que exibem a obstrução variável ao fluxo aéreo como característica comum. Em razão dessa heterogeneidade, diversos padrões observáveis da asma, denominados fenótipos, vêm sendo propostos e extensivamente estudados; sejam eles clínicos, de perfis inflamatórios ou ainda resposta a intervenções terapêuticas. Mais além, tem-se buscado definir possíveis subtipos da doença a partir dos distintos mecanismos fisiopatológicos moleculares e celulares, denominados endótipos. [71] Enquanto as características fenotípicas representam observações das dimensões clínicas da asma, a classificação da asma em endótipos estabelece as diferenças entre os diversos mecanismos capazes de produzir a enfermidade. Quanto às classificações, cada endótipo pode compreender vários fenótipos, assim como certos fenótipos podem estar presentes em mais de um endótipo. [72] Dentre os fenótipos observados podemos destacar a asma alérgica, a não alérgica (ou intrínseca), a neutrofílica e a asma relacionada à intolerância a aspirina. [71]

### **1.4.1 Asma alérgica**

A asma alérgica é considerada a forma mais prevalente e com melhor resposta aos tratamentos preconizados. É comum o seu aparecimento ainda na infância e é normalmente acompanhada ou precedida por rinite alérgica e/ou eczema. Este fenótipo de asma tem como características principais a celularidade eosinofílica, a atuação de citocinas padrão Th2, notadamente IL-4, IL-5 e IL-13, e a mediação via imunoglobulina E a partir da interação com alérgeno. Apesar de a reação imunomediada ser a condição chave para este fenótipo, o processo inflamatório pode persistir ou evoluir mesmo na ausência da

exposição ao alérgeno. Interleucinas como a IL-25, IL-33 e a linfopoietina estromal tímica (TSLP), secretadas predominantemente pelas células epiteliais das vias aéreas, também assumem papel relevante na assinatura Th2. [73] Esse grupo de interleucinas, no que concerne a sua função, é capaz de atuar não apenas em linfócitos Th2, como também em células linfóide inatas do tipo 2 – ILC2 que, por sua vez, deflagram a produção de interleucinas padrão Th2 tanto quanto os linfócitos Th2 o fazem. [74] Histologicamente, a asma alérgica é caracterizada por infiltração mucosa com alta concentração de eosinófilos, células CD4+, mastócitos, expressão de receptores com alta afinidade para IgE presentes nas células locais e inflamatórias, hiperplasia de células globosas, espessamento da membrana reticular basal e hipertrofia da musculatura lisa. [71]

#### **1.4.2 Asma não alérgica**

Assim como na asma alérgica, o padrão fenotípico “asma não alérgica” ou “asma intrínseca” é também mediado por linfócitos de perfil Th2, ativação de mastócitos e infiltração eosinofílica. [75] Entretanto, algumas características clínicas e relacionadas a biomarcadores a diferem da asma alérgica. Por exemplo, costuma ser mais grave e incidir na fase mais adulta. Acomete cerca de um terço dos asmáticos adultos e é mais frequente no sexo feminino. [76] Quando incide na infância, costuma apresentar sintomas mais brandos comparados aos adultos e exibe relação com infecções de vias aéreas, exposição à fumaça de cigarro e afecções da via aérea superior. [77] Quanto às interleucinas, existem distinções do padrão alérgico, quer sejam, aumento de IL-2 e IFN- $\gamma$ , bem como redução de IL-4 no lavado broncoalveolar. [78] Todavia, ainda não foram validados biomarcadores para a asma intrínseca. Embora células Th1 e biomarcadores como a IL-18, a IL-15, a IP-10, dentre outros, tenham sido descritos na asma intrínseca, esses achados ainda carecem de validação. [71]

Quanto à etiopatogenia, se por um lado os alérgenos comuns não parecem estar associados a esse fenótipo, por outro, a presença de superantígenos pode estar relacionada a geração do processo inflamatório. Os mecanismos envolvidos incluiriam proliferação local de células B, aumento da produção de IgE policlonais e específicas contra superantígenos que cursariam com expansão de células T (padrão Th2) e células CD8+. [79]

### 1.4.3 Asma não eosinofílica

A asma não eosinofílica é um fenótipo caracterizado pela ausência de eosinofilia nas vias aéreas, porém marcada pelo aumento de neutrófilos. [80] Até hoje, especula-se se a asma neutrofílica seria uma entidade distinta de asma, ou se representa meramente um estado de gravidade aumentada ou mesmo consequência de infecção ou colonização bacteriana persistente das vias aéreas. Em adultos é mais comum em mulheres. [81] Em crianças, parece ser mais frequente na forma não atópica da doença. [82] A predominância de neutrófilos nesta forma de asma talvez se deva a outro subgrupo de linfócitos CD4+, os linfócitos Th17. Estas células estão entre as que liberam a IL-17, que por sua vez estimula o epitélio respiratório a produzir citocinas e quimiocinas, dentre elas a IL-8, uma potente quimiocina de atração neutrofílica. [83] Embora a IL-17 esteja relacionada ao remodelamento, gravidade da asma e haja uma forte correlação entre a IL-17 e a concentração de neutrófilos no sangue e escarro, [84] o uso de terapia com anticorpo monoclonal anti IL-17 não demonstrou efeito clínico significativo. [85]

### 1.4.4 Asma relacionada à intolerância a aspirina

Afetando aproximadamente entre 5 e 10% dos adultos asmáticos, a asma relacionada à intolerância a aspirina é mais comum em mulheres — cujos sintomas tendem a ser mais graves que em homens —, é rara em crianças, e exibe menor relação com a atopia. Os sinais e sintomas apresentam um padrão sequencial, iniciando já na fase adulta, com rinite, evoluindo com asma, intolerância à aspirina e, finalmente, polipose nasossinusal. [86] Apesar da intolerância a aspirina ser uma característica marcante do fenótipo, evitar este tipo de medicamento não parece ter efeito em atenuar o curso da doença. Não obstante, os pacientes devem abster-se de usá-los, tendo em vista a grande incidência de crises asmáticas graves relacionadas ao uso de aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais. É incerto caracterizar a asma relacionada à intolerância à aspirina como um endótipo por parecer tratar-se de uma condição adquirida no curso da asma não alérgica ou, menos frequentemente, asma alérgica. [71] Atualmente, recomenda-se denominar esta enfermidade como DREA (acrônimo para Doença Respiratória Exacerbada por Anti-inflamatórios não Esteroidais), por se tratar de uma condição de hipersensibilidade cruzada, em que pacientes com hipersensibilidade a um anti-inflamatório reagem a aspirina, bem

como a outros anti-inflamatórios inibidores da Cox-1. [87] Diretrizes recomendam que o diagnóstico desse fenótipo deve compreender testes de provocação brônquica ou nasal com a aspirina e, caso esses sejam inconclusivos, o teste de provocação oral está indicado. [88]

### **1.5 Endótipos da asma**

Nos últimos anos, além do conhecimento sobre as características fenotípicas de cada doença, tem-se buscado definir subtipos a partir de distintos mecanismos fisiopatológicos moleculares e celulares denominados endótipos. [71] Enquanto as características fenotípicas representam observações das dimensões clínicas da asma, a classificação da asma em endótipos estabelece as diferenças entre os diversos mecanismos capazes de produzir a enfermidade. A principal vantagem em desvendar os mecanismos fisiopatológicos é permitir uma forma de tratamento mais individualizada e fundamentada no(s) desequilíbrio(s) molecular(es)/celular(es) evidenciado(s) pela endotipagem, sendo esta atuação, direcionada e específica, parte de um conceito denominado “medicina de precisão”. A medicina de precisão deve englobar a avaliação da real dimensão do impacto que uma doença ocasiona na vida do paciente (medida, por exemplo, por questionários de qualidade de vida), o escrutínio dos mecanismos fisiopatológicos celular e molecular envolvidos, o entendimento preciso sobre as consequências da progressão da doença e a informação apropriada ao paciente sobre as estratégias terapêuticas disponíveis, incluindo os objetivos, os benefícios esperados e os efeitos adversos. [89]

Por ora, muitos autores vêm propondo classificações endotípicas distintas. Além disso, cada endótipo pode compreender vários fenótipos, assim como certos fenótipos podem estar presentes em mais de um endótipo. [72]. Para a asma, os endótipos Th2 alto e Th2 baixo são bem reconhecidos e utilizados como parâmetros para intervenções específicas. Ademais, muitos subtipos – subendótipos - podem ser observados com base nos principais mecanismos moleculares em ação. Como exemplos de subendótipos Th2 alto podemos destacar aqueles com alta concentração de IL-5, de IL-13 ou de IgE. [90] Neste sentido, os endótipos tipo Th2 podem ser definidos por subgrupos de pacientes que apresentam resposta satisfatória a tratamentos direcionados a IL-5, a IL-13 ou a IgE. [89] Em relação ao endótipo Th2 baixo, os mecanismos atuantes são menos claros. A inflamação neutrofílica, característica desse endótipo, pode estar relacionada a dois mecanismos: a) anormalidades intrínsecas dos neutrófilos secundárias a distúrbios da

imunidade inata e b) a ativação de uma via dependente da IL-17 capaz de induzir a secreção de IL-8 de atividade neutrofílica. [91-93] Algumas interleucinas parecem estar associadas a este endótipo — IL-8, IL-17, IL-22, IL-23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  — entretanto, nenhuma intervenção baseada nesses endótipos demonstrou-se efetiva. [89]

## 1.6 Endótipos nas rinites e rinossinusites

A caracterização fenotípica das rinites tem sido útil tanto na definição de subtipos da doença — rinite alérgica, rinite não alérgica e rinite infecciosa —, [94] como também na construção de algoritmos de tratamento baseados em evidência. Entretanto, como na asma, uma parcela de pacientes com rinite alérgica é refratária às estratégias terapêuticas baseadas em fenótipos, [95] revelando a necessidade do aprofundamento do conhecimento a respeito dos endótipos. Entre os endótipos propostos para as rinites podemos destacar a rinite com resposta imunológica do tipo 2 mediada por IgE específica, iniciada pela ligação cruzada entre as moléculas antigênicas e os anticorpos IgE acoplados sobre a superfície de mastócitos, deflagrando sintomas agudos e o influxo de eosinófilos, basófilos, células T e B para a mucosa nasal. [96] Além disso, substâncias de baixo peso molecular, de origem ocupacional ou ambiental, podem também iniciar ou agravar uma resposta imune do tipo Th2 por meio de agressão epitelial e consequente liberação de TSLP, IL-33 e IL-25. [97] Uma resposta inata e adaptativa do tipo 1/IL-17 estimula o influxo de neutrófilos e células T produtoras de IFN- $\gamma$  e poderia estar relacionada à rinite infecciosa. [98]

As rinossinusites também são doenças com notória heterogeneidade e cujas características fenotípicas, por exemplo, presença ou ausência de polipose nasossinusal, têm direcionado abordagens terapêuticas baseadas em evidências. Além disso, essa diferenciação fenotípica tem sido recentemente corroborada por padrões endotípicos diversos. Por exemplo, enquanto na rinossinusite sem polipose a TGF- $\beta$  e seus receptores estão aumentados, na rinossinusite com polipose essa interleucina parece estar reduzida. Aparentemente, esse padrão inflamatório parece ser homogêneo ao redor do mundo. [99, 100] Todavia, no que diz respeito ao padrão inflamatório da polipose, podem ocorrer variações longitudinais, pois no hemisfério norte ocidental existe o predomínio eosinofílico orquestrado pela inflamação Th2, [101] enquanto em países orientais como a China, o padrão inflamatório parece ser preponderantemente Th1 e Th17. [102] Alguns

endótipos propostos poderiam englobar, portanto, o padrão Th2, a TGF- $\beta$  e a IgE específicas para superantígenos, tendo em vista que uma inflamação Th2 pode ser amplificada pela ativação de superantígenos estafilocócicos. [103]

### **1.7 Métodos de avaliação da inflamação das vias aéreas**

A inflamação das vias aéreas, à luz dos conhecimentos atuais, é tida como central na patogênese de doenças como a asma, a rinite, a DPOC e a rinosinusite crônica [1, 16, 104, 105] Nas últimas décadas, diversas técnicas têm sido concebidas com o intuito de escrutinar o processo inflamatório das vias aéreas. Ao longo deste período, tornou-se necessária a utilização de métodos seguros, pouco invasivos e capazes de fornecer informações fidedignas sobre os biomarcadores implicados em cada doença. O estudo das medidas do processo inflamatório em espécimes de escarro aproximou-se desses objetivos. A indução do escarro via inalação de solução salina hipertônica foi introduzida em 1958 por Bickerman e colaboradores [106] para o diagnóstico de neoplasia de pulmão. Ao longo da década de 80 do século passado, a indução do escarro foi empregada para obter, de modo direto, as secreções das vias aéreas e possibilitar o diagnóstico de pneumonias por *Pneumocystis carinii* em pacientes infectados pelo vírus HIV. [107] Posteriormente, Gibson e colaboradores, em 1989, investigaram as características celulares do escarro produzido espontaneamente e observaram que o perfil inflamatório dos pacientes asmáticos era caracteristicamente composto por eosinófilos, propondo que o escarro fosse uma fonte importante na investigação do processo inflamatório. [108] Porém, um dos progressos mais importantes na investigação da inflamação das vias aéreas inferiores foi a introdução, por Pin e colaboradores, em 1992, [109] da indução do escarro na investigação do processo inflamatório em pacientes asmáticos. O uso do escarro induzido pela inalação de solução hipertônica exhibe uma série de vantagens sobre outros métodos, como o uso da broncoscopia — segurança e praticabilidade são as mais óbvias. Além disso, é relativamente não invasivo e pode ser realizado de modo aleatório e repetitivo. [110] Pode ser aplicado em pacientes com asma ou DPOC de diferentes gravidades, desde que seja utilizado um método de indução modificado para garantir sua segurança. [111] A utilização do exame do escarro induzido tem se mostrado instrumento útil para caracterizar a resposta inflamatória, em nível celular, das vias aéreas em pacientes com doenças respiratórias inflamatórias [112] e o exame dos

componentes celulares e da fase líquida do escarro induzido tem se mostrado reprodutível, válido e responsivo às mudanças longitudinais. [110, 111, 113]

Vários métodos têm sido propostos para avaliar a resposta inflamatória na mucosa nasal possibilitando que o padrão de distribuição celular e inúmeros mediadores inflamatórios possam ser mensurados. [114] No ano de 1983 foi implantado, por Naclerio e colaboradores, [115] um modelo de avaliação da resposta inflamatória nasal pelo lavado nasal, que já passou por algumas modificações. [116, 117] Este método permite, de maneira rápida e acessível, a obtenção de diversas medidas, desde componentes celulares até mediadores inflamatórios, a depender do objetivo do examinador. Entretanto, uma das grandes dificuldades em conduzir estudos relativos ao processo inflamatório da mucosa nasal é justamente a escolha do método mais adequado para realizar a coleta das secreções. Algumas técnicas podem ser consideradas invasivas ou parcialmente invasivas, como a biópsia e a curetagem, respectivamente, enquanto outras podem acarretar algum grau de desconforto no paciente examinado, como é o caso da lavagem nasal. [114] Ademais, outras técnicas têm sido desenvolvidas, como demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Métodos para a obtenção de espécimes da cavidade nasal

Estudo	Objetivo	Técnica	Resultados	Comentários
<b>Melilo (1998) [118]</b>	Desenvolver um método pouco invasivo, padronizado e reprodutível.	Nebulização por ultrassom	Mostrou-se válido e reprodutível na capacidade de diferenciar pacientes com rinite alérgica e rinite não alérgica eosinofílica.	É pouco invasivo, podendo ser utilizado de forma repetitiva, inclusive em crianças.



<b>Estudo</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Técnica</b>	<b>Resultados</b>	<b>Comentários</b>
<b>Walsh (1999) [119]</b>	Descrever um método eficiente e reprodutível para coletar secreções nasais e determinar títulos de IgA.	Swab	Os resultados pela técnica do swab foram reprodutíveis quando as amostras foram coletadas com muitas semanas de intervalo nos sujeitos idosos.	A correlação entre as amostras pareadas do lavado nasal e do swab foi menor em indivíduos idosos.
<b>Watelet, J.B.(2003) [120]</b>	Propor uma nova técnica para obtenção de secreção nasal para análises imunológicas de maneira padronizada.	Tampão	O método é não invasivo, padronizado e reprodutível e pode servir como uma ferramenta válida para futuras investigações.	Representa uma ferramenta válida e reprodutível para coleta de secreções nasais.
<b>Lü, F.X.(2010) [121]</b>	Desenvolver e demonstrar as características de uma nova técnica de coleta de secreções nasais e as suas vantagens.	Lavado nasal e esponjas sintéticas acopladas a coletores.	As concentrações de citocinas, eosinófilos, ECP e triptase nas secreções obtidas pelo coletor foram no mínimo 8 vezes maiores se comparadas à do lavado nasal.	O uso da esponja sintética de poliuretano demonstrou maior sensibilidade na detecção dos mediadores.

Posteriormente, devido a alguns problemas metodológicos durante o estudo do fluido nasal obtido por meio do lavado, [116, 122] outras técnicas têm sido concebidas. A obtenção de medidas por meio da absorção dos líquidos para uma matriz sintética absorviva (MSA) é um destes exemplos. O método foi originalmente introduzido por Knowles e colaboradores [123] quando pretendiam efetuar uma análise quantitativa de secreções nasais — nasoabsorção. O fluido nasal, obtido por uma MSA, pode ser ultracentrifugado [124] e as medidas de diversos biomarcadores podem ser efetuadas por meio de “plataformas

*multiplex*”, que possibilita avaliar em tempo único a concentração de citocinas, quimiocinas, mediadores pró e anti-inflamatórios, fatores de crescimento, dentre outros.

Se por um lado o lavado nasal tem se mostrado insatisfatório por conta de sua pobre reprodutibilidade, uma vez que a tendência da irrigação é a diluição dos mediadores, o método por absorção é não invasivo e pode ser usado em repetidos intervalos de tempo. Também exibe a vantagem de coletar diretamente secreções que estão menos diluídas, possibilitando a detecção de sinais proteicos que estariam abaixo dos limites da detecção se coletados pelo método do lavado. [125, 126] Chawes e colaboradores, 2010, [127] demonstraram a possibilidade de detecção de interleucinas dispensando a necessidade de provocação nasal prévia e esta técnica tem sido submetida à validação. [121, 128] A nasoabsorção tem sido utilizada em crianças [127], neonatos, [129] e após nasoprovação antigênica específica. [128, 130] Um exemplo de MSA é o *Leukosorb*<sup>®</sup>, produto patenteado pela empresa *Pall Corporation (Pall Life Sciences, Ann Arbor, Mich)*, que consiste em uma matriz fibrosa altamente hidrofílica com poros de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ , desenvolvida originalmente para procedimentos de isolamento de leucócitos em amostras de sangue.



## 2 JUSTIFICATIVA

Muito se tem feito no sentido de adequar métodos que permitam a mensuração do processo inflamatório nas vias aéreas de maneira simples e fidedigna. O conhecimento do perfil inflamatório de cada paciente, aliado a outras informações como a sua característica clínica, fisiologia pulmonar, genética, anatomia patológica, epidemiologia da doença e sua resposta a tratamentos, poderia contribuir para a identificação de possíveis endótipos da asma. Com isso, teríamos condições de selecionar adequadamente sujeitos para estudos científicos e, com o avanço do conhecimento sobre as fisiopatologias, a possibilidade norteadora para a escolha do tratamento específico para cada subtipo da doença. Por exemplo, diante de resultados relativamente desapontadores em pacientes asmáticos com o uso de terapia anti-IL5, o Mepolizumab, [131, 132] quando a seleção dos sujeitos levou em conta as características fenotípicas inflamatórias da doença, a droga foi reconhecida como uma alternativa ao tratamento da asma eosinofílica. [133]

Com o conceito estabelecido de vias aéreas unidas é plausível que as suas medidas do processo inflamatório possam ser estudadas em espécimes das vias aéreas inferiores e superiores. Neste sentido, as atenções têm se voltado para a mucosa do nariz, por ser esta mais acessível, com menor potencial de riscos, maior conforto ao paciente e, promissoramente, a de menor custo.

A questão a ser respondida por este estudo é relevante para aprofundar a compreensão do conceito inflamação nas doenças respiratórias ao adicionar informações úteis na aplicabilidade do exame das fases líquidas do escarro e do fluido nasal. A demonstração da correlação e da concordância entre o perfil inflamatório do nariz e do pulmão, bem como a análise da técnica do fluido nasal concernente a sua capacidade de discriminar perfis inflamatórios, poderiam permitir, no futuro, o aperfeiçoamento e a simplificação da metodologia empregada em mensurar os biomarcadores das vias aéreas. Se por um lado o escarro só pode ser analisado em poucos laboratórios no mundo com equipamento e pessoal qualificado, a técnica de coleta do fluido nasal por meio da MSA poderia ser executada em qualquer local, o material centrifugado, congelado, e a fase líquida enviada a um laboratório central para determinação de um painel de interleucinas. Assim, foi delineado este estudo para investigar a exequibilidade do método de coleta de espécimes do fluido nasal e escarro induzido por

meio de uma MSA, estudar a correlação entre a medida de um painel de interleucinas do fluido nasal e escarro induzido (IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , Eotaxina-1, IP-10 e TNF- $\alpha$ ), bem como o poder discriminatório entre dois grupos de indivíduos: um grupo composto por participantes com asma sem uso de tratamento controlador e um segundo grupo controle composto de indivíduos normais.

### **3 HIPÓTESES**

#### **3.1 Hipótese nula**

O método de coleta de espécimes do fluido nasal e escarro induzido por meio de MSA é inexecutável.

#### **3.2 Hipótese alternativa**

O método de coleta de espécimes do fluido nasal e escarro induzido por meio de MSA é executável.



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Investigar a exequibilidade do método de coleta de espécimes do fluido nasal e escarro induzido por meio de MSA em participantes asmáticos sem uso de tratamento controlador e indivíduos saudáveis sem prévia naso ou broncoprovocação.

### **4.2 Objetivos específicos**

- a) Investigar a correlação entre as medidas de um painel de interleucinas do fluido nasal e do escarro induzido coletadas por meio de uma MSA;
- b) Determinar a contagem de células total e diferencial da amostra do escarro induzido;
- c) Correlacionar os perfis inflamatórios — molecular e celular — entre o fluido nasal e o escarro induzido;
- d) Determinar o poder discriminatório do padrão inflamatório do fluido nasal entre os grupos.





## 5 MÉTODOS

### 5.1 Delineamento do estudo

Estudo de delineamento transversal, envolvendo dois grupos de indivíduos. Os participantes preencheram os critérios pré-estabelecidos e foram incluídos na pesquisa. Resumidamente, o estudo consistiu em:

- a) Caracterização do participante como normal ou asmático sem uso de medicação controladora;
- b) Indução e processamento do escarro, uma parte serviu para a obtenção de citospinas e outra para a absorção com MSA – *Leukosorb*<sup>®</sup>;
- c) Absorção do fluido nasal e do escarro induzido por meio de MSA – *Leukosorb*<sup>®</sup>;
- d) Avaliação das medidas de um painel de interleucinas inflamatórias do nariz e pulmão – IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , Eotaxina-1, IP-10 e TNF- $\alpha$ .

As medidas do perfil inflamatório foram realizadas no mesmo intervalo de tempo por meio do equipamento *Luminex 200*<sup>®</sup>. A obtenção dos perfis clínicos e inflamatórios medidos no escarro e no fluido nasal foi realizada às cegas um em relação ao outro.

### 5.2 Amostra

Considerando a probabilidade de 0,5% de se rejeitar a hipótese nula mesmo sendo esta verdadeira ( $\alpha = 0,05$ ), a probabilidade de 20% de não rejeitá-la sendo a mesma falsa ( $\beta = 0,20$ ) e o coeficiente de correlação estimado em 0,5, uma amostra calculada de 29 participantes é suficiente para avaliar a correlação entre as medidas recuperadas do fluido nasal e do escarro induzido. [134] Utilizou-se uma subamostra (8 asmáticos e 3 normais, n=11) para o estudo da concordância entre 2 medidas de espécimes coletados sequencialmente.

### 5.3 Participantes

Os participantes asmáticos foram selecionados entre pacientes dos ambulatórios de pneumologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e pacientes da rede privada. Os

participantes saudáveis foram recrutados entre os pesquisadores e estudantes. Todos os participantes preencheram os critérios pré-estabelecidos de inclusão e exclusão abaixo discriminados:

### **5.3.1 Asmáticos sem uso de tratamento controlador**

- a) Adultos com idade superior a 18 anos e que apresentassem asma, cujo diagnóstico tenha sido confirmado objetivamente nos últimos 3 anos por limitação reversível ao fluxo de ar (aumento do  $VEF_1 \geq 200$  ml e 12% de variação ou mais após a inalação de broncodilatador de curta duração) nos participantes com limitação ao fluxo de ar das vias aéreas ( $VEF_1/CVF < 0,7$ ) ou por hiperresponsividade das vias aéreas à metacolina ( $PC_{20} < 8\text{mg/ml}$ ) quando de um  $VEF_1 > 70\%$  do previsto;
- b) Asma estável, indicada pela presença de sintomas que não se alterem na última semana;
- c) Nunca terem fumado ou não fumantes há mais de um ano e com história de tabagismo menor que cinco maços/ano;
- d) Em uso apenas de broncodilatadores de alívio e sem uso de medicações controladoras (corticóide oral ou inalatório) nos últimos três meses;
- e) Sem uso de corticóides nasais nos últimos dois meses;
- f) Livres de infecção respiratória nas últimas quatro semanas;
- g) Capazes de produzir escarro induzido e fluido nasal;
- h) Capazes de fornecer consentimento informado antes do estudo.

### **5.3.2 Normais**

- a) Ausência de sintomas respiratórios;
- b) Não atópicos (confirmado por meio do teste de punctura para alérgenos inalados);
- c) Sem uso de corticóides nasais nos últimos dois meses;
- d) Nunca terem fumado ou não fumantes há mais de um ano e com história de tabagismo menor que cinco maços/ano;
- e) Livres de infecção respiratória nas últimas quatro semanas;
- f) Capazes de fornecer consentimento informado antes do estudo.

### 5.3.3 Critérios de Exclusão

- a) Participantes intolerantes aos procedimentos de coleta ou incapazes de produzir escarro induzido e/ou fluido nasal;
- b) Doenças graves ou uso de medicações que pudessem confundir os resultados, tais como antibióticos, anti-inflamatórios não esteroidais, anticorpos monoclonais, dentre outras;
- c) Doenças pulmonares conhecidas (fibrose cística, pneumonia, dentre outras);
- d) Uso de cocaína;
- e) Gestantes.

### 5.4 Aspectos éticos

A participação neste estudo foi voluntária e cada participante assinou um consentimento após informação completa verbal e por escrito do estudo. O protocolo do estudo, incluindo a versão final do consentimento informado ao participante foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina – parecer consubstanciado n° 013/08. (Anexo I) Os participantes foram informados que poderiam descontinuar sua participação no estudo a qualquer momento sem que isso lhes trouxesse algum inconveniente.

Por fim, os autores declaram que não houve financiamento ou vínculos econômicos de qualquer natureza por parte de empresas privadas. Os produtos *Luminex*<sup>®</sup> e *Leukosorb*<sup>®</sup> estão protegidos por direitos autorais e inexistem conflitos de interesse no desenvolvimento desta pesquisa.

### 5.5 Coleta de dados

A avaliação dos participantes e as respectivas coletas foram realizadas, em sua maioria, em apenas uma visita. Entretanto, em algumas ocasiões, foi necessária uma segunda visita para a efetuar o teste cutâneo alérgico (*Prick Test*). O período transcorrido entre a primeira e a segunda visita foi de aproximadamente 1 semana.

#### 5.5.1 Visita 1

- a) Consentimento escrito e informado; (Anexo II)
- b) Breve história médica para documentar elegibilidade. Um

formulário para anotar dados, características demográficas, o código do participante e os critérios de elegibilidade foi preenchido;

- c) Espirometria realizada de acordo com as especificações da *American Thoracic Society* [135]. O VEF<sub>1</sub> basal foi calculado como a média de três valores reprodutíveis (alteração máxima de 5%). A responsividade dos asmáticos ao uso de  $\beta_2$ -agonista foi determinada pela administração de 200  $\mu$ gcs de Salbutamol, via espaçador, e então repetindo a espirometria após 15 minutos;
- d) Indução do escarro por meio da inalação de aerossol de solução salina com um débito de 0.8ml/minutos e partículas de diâmetro médio de 4 $\mu$ . Conduzido de acordo com o método descrito por Pizzichini e colaboradores. [113]. Em síntese, o procedimento foi iniciado após uma espirometria pré e pós-broncodilatador para obtenção dos valores basais. A indução do escarro envolveu a inalação de 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 VEF<sub>1</sub>. Os participantes foram orientados a enxaguar a boca, engolir a água e assoar o nariz para minimizar a contaminação com saliva ou descarga pós-nasal. A seguir, foram instruídos a tossir e depositar o escarro em um recipiente 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 VEF<sub>1</sub> igual ou superior a 20%;
- e) Rinoscopia anterior para a visibilização direta das cavidades nasais e colocação das tiras de filtro de papel (*Leukosorb*<sup>®</sup>) sobre a mucosa nasal. **(Item 5.5.3)**

### 5.5.2 Visita 2 (aproximadamente após 1 semana)

- a) Teste cutâneo de leitura imediata a alérgenos inalados comuns, se não foram realizados no último ano, técnica *prick* modificada, [136] foi conduzido para os seguintes alérgenos: penas, gato, cão, pólen de gramíneas, fungos,

barata doméstica, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e ácaros de estocagem, além dos controles negativo (glicerol e tampão) e positivo (histamina e fosfato - 10 mg/ml). O teste foi lido após 15 minutos e o resultado expresso como tamanho dos círculos em milímetros. Os círculos com diâmetro igual ou superior a 3 x 3 milímetros comparados ao controle positivo com histamina foram considerados positivos.

### 5.5.3 Métodos Complementares

- a) O escarro foi processado dentro de duas horas, seguindo a técnica descrita por Pizzichini e colaboradores. [112] Inicialmente, as porções densas do material expectorado foram selecionadas a olho nu ou, se necessário, sob visualização por meio de um microscópio invertido, usando-se um fórceps de 115 mm para separar o escarro da saliva. A fração selecionada foi colocada em um tubo de poliestireno de 15 ml e tratada com quatro vezes o seu volume de ditiotreitol (DTT) a 0,1% (*Sputalysin 10%*; *Calbiochem Corp.*, San Diego, CA). O tubo de poliestireno foi então colocado em um agitador de mesa (*Dade Tube Rocker*; *Baxter Diagnostics Corporation*, Miami, FL) 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 48 $\mu$ m (*BBS Thompson*, Scarborough, Ontario) para remover os restos celulares e o muco não dissolvido. Em seguida, foi realizada a contagem celular total de leucócitos, excluindo-se as células escamosas utilizando-se um hemocítmetro de Neubauer modificado. A viabilidade celular foi determinada por meio do método de exclusão pelo *trypan blue* (as células mortas aparecem em azul). Sessenta a oitenta microlitros da suspensão, ajustada para 1.0 x 10<sup>6</sup>/ml, foram colocados em recipientes para uma citocentrífuga *Shandon III* (*Shandon Southern Instruments*, Sewickley, PA) e quatro citospinas codificadas foram preparadas a 450 rpm por 6 minutos. Depois de secar ao ar livre, as citospinas foram coradas pelo corante de Giemsa para

a contagem diferencial de células, sendo que 400 células não escamosas foram contadas na lâmina de melhor qualidade.

- b) Obtenção do fluido nasal: técnica modificada de Chawes e colaboradores [127] na qual duas tiras de papel *Leukosorb*<sup>®</sup> foram cortadas com tesoura nas dimensões 7 x 30 mm cada. Com o paciente sentado em posição confortável e cabeça levemente estendida, as duas tiras de papel foram inseridas, sob visualização direta, na cavidade nasal com o auxílio de um fotóforo (foco de luz frontal) e um espéculo nasal de Killian. (Figura 1) As tiras foram posicionadas sobre a mucosa nasal, uma sobre a porção anterior da concha inferior e outra sobre a região septal caudal e mantidas no local por dois minutos para a absorção do fluido nasal. Para a análise da concordância entre as medidas em duplicata, em 13 participantes duas tiras adicionais foram inseridas, sequencialmente, na narina contralateral e mantidas sobre a mucosa por dois minutos;
- c) Obtenção do fluido do escarro: após a indução, uma parte do escarro induzido foi reservada para a colocação da MSA. Assim, duas tiras de *Leukosorb*<sup>®</sup> foram mantidas em contato com o escarro durante dois minutos para a absorção. Para a análise da concordância entre medidas em duplicata, em 13 participantes duas tiras adicionais foram também colocadas e mantidas sobre a secreção por dois minutos;
- d) Determinação do painel de interleucinas do fluido nasal e da fase líquida do escarro induzido: as tiras foram imersas no meio tamponado *Milliplex Assay Buffer* 200µL + Inibidor de Protease DPP-IV 4µL, contidos em um tubo com filtro – *Costar*<sup>®</sup> *Spin-X*<sup>®</sup> acoplado ao Eppendorf. O fluido foi misturado às tiras *Leukosorb*<sup>®</sup> por meio de um Vortex mixing durante aproximadamente 20 segundos. O material foi centrifugado a 16000g durante 10 minutos (em centrífuga refrigerada a 4°C). O filtrado ficou retido no recipiente abaixo do filtro enquanto as tiras secas foram desprezadas. Novamente o filtrado foi agitado por 5 segundos com o Vortex e distribuído em alíquotas de 75 µl a 100 µl em criotubos e armazenado a - 80°C. O material foi transportado a um laboratório central e, após o descongelamento, analisado pelo *Luminex 200*<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos em pg/ml.

### 5.5.4 Materiais e equipamentos necessários

- a) Kit com punctores descartáveis (Fabricante Alko do Brasil, Rio de Janeiro, RJ) e extratos alergênicos para diagnósticos composto por 10 antígenos inalatórios (Fabricante Alergotatina, Rio de Janeiro, RJ)
- b) Papel *Leukosorb*<sup>®</sup> (Fabricante *Pall Life Sciences*, Portsmouth, Cat no. BSP0669)
- c) Espirômetro *Koko-Trek Spirometer* (Fabricante *Trudal Medical*, London, Ontario)
- d) Espaçador (*Aerochamber*)
- e) Nebulizador ultrassônico (Fabricante *Fisoneb*)
- f) Tubos para centrifugação com filtro de celulose acetato - *Spin Filters* em tubos Eppendorf. *Costar*<sup>®</sup> *Spin-X*<sup>®</sup> centrifuge tube filters, tamanho dos poros 0.22  $\mu\text{m}$  (Fabricante *Sigma-Aldrich*, Cat no. CLS8161)
- g) Tubos Eppendorf (Fabricante *VWR International* Cat no. 211-2130)
- h) *Milliplex Assay Buffer* (Fabricante *Millipore*, Cat no. L-AB)
- i) Inibidor de Protease DPP-IV (Fabricante *Millipore* Cat no. DPP4, DPP4-010)
- j) Tubos criogênicos de 2ml, auto-sustentáveis (Fabricante *Techno Plastic Products AG*. Cat no. 89020)
- K) Espéculo nasal de Killian (esterilizado), pinça baioneta (esterilizada), fotóforo, isopor com gelo
- l) Micropipeta P10, Vortex, balança digital
- m) Kit *Milliplex* para 10 analitos - *Human Cytokine Magnetic* (Fabricante *Millipore* identificação do kit: HCYT-MAG-60K-10)



Figura 1 - Inserção da matriz sintética absorviva na cavidade nasal



## 5.6 Medidas

### 5.6.1 Desfecho principal

Medidas do painel de interleucinas — IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , Eotaxina-1, IP-10 e TNF- $\alpha$  — da fase líquida do fluido nasal e do escarro induzido obtidas por meio de uma matriz sintética absorviva, *Leukosorb*<sup>®</sup>, processadas e posteriormente analisadas pela plataforma multiplex *Luminex 200*<sup>®</sup> utilizando-se um kit magnético — *Milliplex Human Cytokine Magnetic* (HCYT-MAG-60K-10). O equipamento *Luminex 200*<sup>®</sup> *IS Analyser* (*Luminex Corp., Austin, Tex*) é baseado em citometria de fluxo e dispõe de microesferas (*beads*) de poliestireno ou paramagnéticas cromatizadas internamente com fluoróforos vermelhos e infravermelhos de diferentes intensidades. A cada microesfera é conferido um padrão de marcação peculiar, o que permite a diferenciação de uma microesfera da outra. Várias microesferas específicas para cada analito podem ser, em seguida, combinadas em um único poço de uma placa de ensaio e esta, por sua vez, pode abrigar até 96 poços preparados a detectar e quantificar simultaneamente vários analitos. A sensibilidade do kit para as interleucinas foi: IL-1 $\beta$ : 1,0 pg/ml; IL-5: 0,7 pg/ml; IL-8: 0,7 pg/ml; IL-10: 1,6 pg/ml; IL-13: 1,9 pg/ml; IL-17: 1,2 pg/ml; IFN- $\gamma$ : 1,1 pg/ml; Eotaxina-1: 6,8 pg/ml; IP-10: 14,0 pg/ml e TNF- $\alpha$ : 1,1 pg/ml.

### 5.6.2 Eventos medidos no escarro

Contagem total e diferencial de células. A eosinofilia e a neutrofilia do escarro definidas por uma contagem diferencial de eosinófilos  $\geq 3\%$  e  $\geq 65\%$ , respectivamente. [137].

## 5.7 Análise estatística

Uma análise descritiva foi utilizada para sumarizar as características dos sujeitos. Os dados contínuos foram analisados quanto a sua distribuição pelo método de Shapiro-Wilk, e expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana  $\pm$  intervalo interquartil. As diferenças entre os grupos normais e asmáticos, tanto para a celularidade do escarro como para as interleucinas, foram examinadas pelo teste não paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney e, em caso

de distribuição paramétrica, o teste t para amostras emparelhadas. Em caso de variáveis categóricas foi utilizado o teste  $\chi^2$ . A concordância entre as medidas em duplicata foi avaliada pelo coeficiente de correlação intraclasse. A correlação entre o perfil inflamatório do fluido nasal e do escarro induzido foi determinada pelo coeficiente de Spearman. A correção *post-hoc* de Bonferroni foi aplicada para o estudo das múltiplas correlações e o nível de significância ajustado para 0,008. A análise multivariada de componentes principais foi aplicada para a identificação de possíveis constructos a partir das relações entre as variáveis e a análise de regressão logística com dados transformados (logaritmo natural) foi usada para a detecção de variáveis preditivas no fluido nasal relacionadas ao perfil inflamatório do escarro induzido.



## 6 RESULTADOS

### 6.1 Características dos participantes

A Tabela 1 sumariza as características dos sujeitos. No total 53 participantes — 32 asmáticos (idades entre 18 e 53) e 21 normais (idades entre 25 e 57 anos) — participaram do estudo. Dois participantes — um asmático e um normal — desistiram durante o procedimento de indução do escarro. Três participantes — um asmático e dois normais — foram excluídos por apresentarem amostras de escarro inadequadas para o estudo da celularidade. Por fim, um participante normal foi excluído por ter expelido, no decorrer da indução do escarro, diversos tonsilólitos (caseum). Em asmáticos, o número de participantes do sexo feminino foi maior que o sexo masculino (2:1). Além disso, a média de idade em asmáticos foi menor comparada aos participantes normais (31,8 vs 43,1; p valor 0,005).

Tabela 1 - Características dos sujeitos

	<b>Normais</b>	<b>Asmáticos</b>
Sujeitos	17	30
Sexo		
Masculino	10	10
Feminino	7	20
Idade (Média ± DP)	43,1 ± 13,3	31,8 ± 12,4
Atopia (%)	0	29 (97%)
VEF1% pré BD (Média± DP)	93,5 ± 11,4	78,9 ± 11,9
VEF1/CVF% pré BD (Média± DP)	0,94 ± 0,5	0,71 ± 0,1

VEF1: volume expiratório forçado do 1o segundo; CVF: capacidade vital forçada; BD: broncodilatador; DP: desvio padrão

### 6.2 Biomarcadores

Todos os analitos foram mensuráveis. Alguns resultados, todavia, situaram-se abaixo do limite de quantificação. Desses, o IFN- $\gamma$  foi o que apresentou o maior número de valores abaixo do limite de quantificação (40% das medidas) ao passo que a IL-8 e a IP-10 não apresentaram nenhum resultado abaixo do limite. Pelo contrário, um valor de IP-10 do fluido nasal de um indivíduo asmático excedeu o limite superior de quantificação. (Tabela 2)

Tabela 2 - Resultados fora do espectro de quantificação

Interleucinas	Normais (n=17)		Asmáticos (n=30)		Total (%)
	Fluido nasal	Escarro	Fluido nasal	Escarro	
IL-1 $\beta$	3	1	10	1	15 (16%)
IL-5	7	11	4	4	26 (27%)
IL-8	--	--	--	--	--
IL-10	--	--	1	--	1 (0,9%)
IL-13	1	5	2	7	15 (16%)
IL-17	2	3	2	6	13 (14%)
IFN- $\gamma$	8	9	9	12	38 (40%)
Eotaxina-1	1	1	2	4	8 (8,5%)
IP-10	--	--	1	--	1 (0,9%)
TNF- $\alpha$	3	4	11	9	27 (28%)

Número de análises de interleucinas fora do limite de quantificação; valores em vermelho: abaixo do limite; valor em azul: acima do limite

O padrão de distribuição dos dados contínuos foi escrutinado e observou-se que, em relação às interleucinas, independentemente de o sítio ser o fluido nasal ou o escarro induzido, todos os dados configuraram distribuição não paramétrica, tanto em participantes asmáticos como normais. A tabela 3 apresenta os valores observados das interleucinas do fluido nasal e escarro induzido.

Tabela 3 - Valores mensurados de interleucinas do fluido nasal e escarro induzido

Interleucinas	Normais (n=17)		Asmáticos (n=30)	
	Fluido nasal	Escarro	Fluido nasal	Escarro
IL-1 $\beta$	2,14 (3,9)	9,26 (15,9)	1,31 (2,9)	10,51 (31,5)
IL-5	0,79 (0,9)	0,22 (0,7)	7,71 (28,0)	2,35 (14,4)
IL-8	3104 (4536)	925 (1047)	1492 (2602)	867 (1454)
IL-10	2,31 (3,3)	1,58 (1,8)	3,95 (11,2)	2,73 (5,4)
IL-13	2,20 (11,8)	1,21 (1,23)	9,46 (19,2)	1,50 (5,4)
IL-17	0,75 (0,9)	0,59 (0,6)	0,7 (1,4)	0,65 (0,5)
IFN- $\gamma$	1,09 (2,3)	0,43 (1,3)	1,16 (2,6)	1,28 (3,7)
Eotaxina-1	21,5 (19,3)	13,3 (25,2)	26,2 (33,6)	12,1 (28,7)
IP-10	3175 (7129)	1337 (8286)	6977 (8747)	2289 (7280)
TNF- $\alpha$	2,50 (6,3)	1,44 (2,9)	2,07 (3,6)	2,88 (6,4)

Valores de interleucinas em pg/ml e expressos como mediana (amplitude interquartilica)

A Tabela 4 sintetiza as características de celularidade do escarro induzido em ambos os grupos. Houve diferença significativa entre os grupos quanto a média de concentração de eosinófilos e linfócitos — p valor < 0,001 e 0,006, respectivamente.

Tabela 4 - Contagem diferencial de células do escarro induzido

<b>Células</b>	<b>Normais (n=17)</b>	<b>Asmáticos (n=30)</b>	<b>p valor</b>
Neutrófilos (%)	44,9 ± 19,5	38,3 ± 22,9	0,43
Eosinófilos (%)	<b>0,1 ± 0,3</b>	<b>6,2 ± 7,9</b>	<b>&lt; 0,001*</b>
Macrófagos (%)	43,7 ± 13,1	45,9 ± 22,2	0,91
Linfócitos em (%)	<b>1,3 ± 1</b>	<b>2,5 ± 1,5</b>	<b>0,006**</b>
Células Epiteliais (%)	9,9 ± 13,9	7 ± 15,6	0,37

Dados expressos como média ± desvio padrão; \*Teste não paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney; \*\* Teste t para amostras independentes

Pela análise da concordância entre as medidas de espécimes em duplicata pôde-se observar que, com exceção da IL-13 do fluido nasal, todas as correlações foram consideradas satisfatórias ou excelentes. (Tabela 5)

Tabela 5 - Análise da concordância entre as medidas em duplicata

<b>Interleucinas</b>	<b>Fluido Nasal</b>	<b>Escarro Induzido</b>
IL-1β	0,60	0,91
IL-5	0,66	0,98
IL-8	0,97	0,98
IL-10	0,66	0,98
<b>IL-13</b>	<b>0,38</b>	0,95
IL-17	0,95	0,91
IFN-γ	0,77	0,99
Eotaxina-1	0,88	0,96
IP-10	0,91	0,87
TNF-α	0,92	0,98

Resultados expressos em coeficiente de correlação intraclasse

O estudo das correlações entre as interleucinas do fluido nasal e do escarro induzido revelou que houve correlações positivas em 5 das 10 interleucinas avaliadas: IL-5 (r = 0,6; p valor < 0,001), IL-10 (r = 0,5; p valor < 0,001), IFN-γ (r = 0,6; p valor < 0,001), IP-10 (r = 0,6; p valor < 0,001) e TNF-α (r = 0,44; p valor 0,002). Além disso, houve correlação para a IL-1 β e a IL-13, porém sem significância estatística. (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação entre medidas de interleucinas do fluido nasal e do escarro induzido em asmáticos e normais

<b>Interleucinas</b>	<b>Correlação</b>	<b>P valor</b>
IL-1 $\beta$	0,4	0,012
<b>IL-5</b>	<b>0,6*</b>	<b>&lt; 0,001</b>
IL-8	0,2	0,13
<b>IL-10</b>	<b>0,5*</b>	<b>&lt; 0,001</b>
IL-13	0,3	0,026
IL-17	0,2	0,3
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>0,6*</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Eotaxina-1	0,03	0,859
<b>IP-10</b>	<b>0,55*</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>0,44*</b>	<b>0,002</b>

Coefficiente de correlação de Spearman; \*estatisticamente significativa após correção de Bonferroni ( $p < 0,008$ )

A avaliação da correlação entre os níveis de citocina do fluido nasal e a contagem de eosinófilos do escarro demonstrou correlação positiva entre nível de IL-5 nasal e eosinófilos no escarro ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,001$ ). Também foram observadas correlações negativas entre a contagem de eosinófilos e IL-1  $\beta$ , IL-8, IL-17 e TNF- $\alpha$ , porém sem significância estatística. (Tabela 7) Adicionalmente, houve correlação positiva entre IL-5 e eosinófilos medidos no escarro ( $r = 0,73$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabela 7 - Correlação entre contagem de eosinófilos do escarro induzido e interleucinas do fluido nasal

<b>Interleucinas</b>	<b>Correlação</b>	<b>P valor</b>
IL-1 $\beta$	- 0,1	0,75
<b>IL-5</b>	<b>0,7</b>	<b>&lt; 0,001*</b>
IL-8	- 0,4	0,02
IL-10	0,3	0,047
IL-13	0,2	0,23
IL-17	- 0,1	0,72
IFN- $\gamma$	0,01	0,94
Eotaxina-1	0,3	0,09
IP-10	0,2	0,14
TNF- $\alpha$	- 0,04	0,79

Coefficiente de correlação de Spearman; \*estatisticamente significativa após correção de Bonferroni

As concentrações de IL-5 do fluido nasal e do IL-5 do escarro induzido de normais e asmáticos foram examinadas e constatou-se diferença estatisticamente significativa em ambas as situações. (Figura 2)

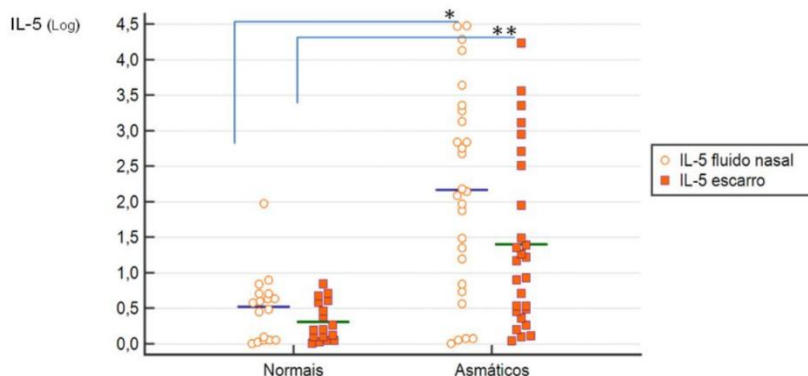


Figura 2 - Concentrações de IL-5 do fluido nasal e IL-5 do escarro induzido em normais e asmáticos. Valores de IL-5 expressos em Log para composição gráfica; \* p valor < 0,001; \*\* p valor 0,001.

A análise multivariada de componentes principais (PCA) com extração de dois fatores identificou, após a remoção de variáveis com baixa carga de comunalidade (IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$ ), dois componentes principais: o primeiro composto por interleucinas com características predominantemente Th1 e o segundo componente com predominância Th2. (Figura 3)



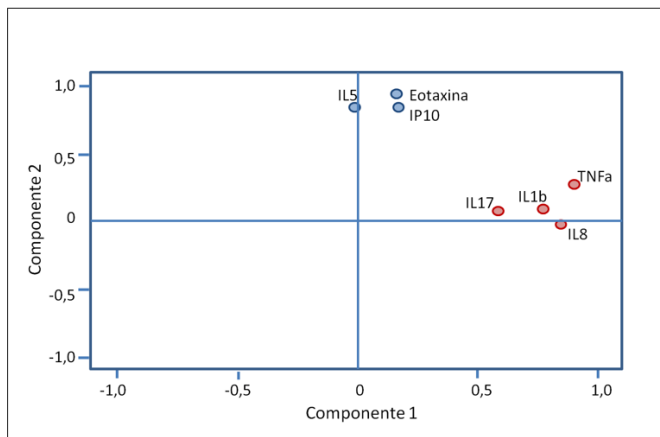


Figura 3 - Análise de componentes principais (PCA) para as interleucinas do fluido nasal em todos os participantes (asmáticos e normais). Após extração em 2 fatores e remoção de variáveis com baixa comunalidade (IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$ ), as variáveis em vermelho — **TNF- $\alpha$** , **IL-8**, **IL-1 $\beta$**  e **IL-17** — são melhor explicadas pelo componente principal 1. As variáveis em azul — **IL-5**, **Eotaxina** e **IP-10** — são melhor explicadas pelo componente principal 2.

A análise multivariada de regressão logística, método *stepwise*, foi aplicada utilizando-se as interleucinas do fluido nasal como variáveis independentes preditivas do perfil inflamatório eosinofílico do escarro induzido, assim caracterizado se a concentração de eosinófilos  $\geq 3,0\%$ . As medidas disponíveis para o ajuste de modelo, como a -2 Log verossimilhança, valor de Cox e Snell, valor de Nagelkerke e medida de Hosmer e Lemeshow, demonstraram adequação de ajuste do modelo. As variáveis inseridas na equação final foram IL-5 e IL-8, sendo a primeira com influência positiva e a segunda com influência negativa sobre o resultado de escarro eosinofílico. A partir do modelo, o percentual de acerto (pertinência prevista para cada grupo) foi de 86,7% para o grupo de escarro não eosinofílico (especificidade) e de 70,6% para o grupo de escarro eosinofílico (sensibilidade). Desta forma, a proporção geral de sucesso foi de 80,9%.

## 7 DISCUSSÃO

Este estudo atestou a exequibilidade do método de coleta de espécimes do fluido nasal e do escarro induzido utilizando-se uma MSA (*Leukosorb*<sup>®</sup>) para a medida de interleucinas — IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , Eotaxina-1, IP-10 e TNF- $\alpha$  —, processadas e posteriormente analisadas em uma plataforma multiplex em participantes asmáticos sem uso de tratamento controlador e participantes saudáveis sem prévia naso ou broncoprovocação. A MSA demonstrou versatilidade para a coleta de espécimes das vias aéreas por ser minimamente invasiva, tolerável, de rápida execução e por possibilitar a detecção dos biomarcadores moleculares prescindindo de provocação alergênica. Além disso, a partir desse método, foram demonstradas correlações positivas entre interleucinas do fluido nasal e do escarro induzido em ambos os grupos. Esse achado é relevante por fortalecer o conceito de via aérea única, tendo em vista que houve correlações positivas entre o fluido nasal e o escarro a partir de cinco — IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , IP-10 e TNF- $\alpha$  — de 10 interleucinas estudadas, além de ter havido correlação positiva entre a contagem de eosinófilos do escarro induzido e a IL-5 do fluido nasal ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,001$ ).

A validade do método da MSA pôde ser assegurada de diversas formas. Por exemplo, a diferença significativa entre as concentrações da IL-5 de indivíduos normais e asmáticos, tanto do fluido nasal como do escarro induzido, traduziu a capacidade do instrumento em revelar grupos distintos. Além disso, os modelos constituídos de análise multivariada também contribuíram para a validade. Inicialmente, com a análise fatorial de componentes principais foi possível identificar, pelas variáveis empregadas, dois principais agrupamentos (*clusters*) de perfil inflamatório, o primeiro com composto por interleucinas com padrão Th1/Th17 e o segundo com interleucinas predominantemente Th2. Em seguida, por meio de uma regressão multivariada logística, ao investigar as interleucinas do fluido nasal como possíveis variáveis preditoras da eosinofilia do escarro, alcançou-se uma proporção de 80,9% de sucesso do modelo gerado, com 86,7% especificidade e 70,6% de sensibilidade. Neste caso, as interleucinas reveladas com capacidade preditora foram a IL-5 e a IL-8, sendo a primeira com influência positiva e segunda com influência negativa no modelo. Quanto à análise da concordância entre medidas em duplicata, observou-se excelente concordância entre as medidas do escarro induzido (ICC 0,87 — 0,99), enquanto para o fluido

nasal as concordâncias variaram entre 0,38 (IL-13) a 0,97 (IL-8). Essa maior amplitude observada no fluido nasal pode ser explicada por limitações inerentes ao método ou especificamente relacionada à citocina medida. Em alguns participantes as tiras de MSA recuperadas estavam secas, o que pode ter influenciado nos resultados. Talvez seja importante mantê-las por mais tempo sobre a mucosa nasal e este aspecto necessita ser avaliado a posteriori. Outra hipótese diz respeito à variação natural de engurgitamento alternante das fossas nasais, conhecida como ciclo nasal, que pode ter influenciado quali ou quantitativamente na característica do material recuperado. Infelizmente não fomos capazes de pesar as tiras antes e após a inserção nas fossas nasais. Entendemos a importância de, futuramente, expor a técnica de coleta de fluido nasal e escarro induzido por MSA à análise da reprodutibilidade, assim como é fundamental testar o modelo de regressão logística em uma segunda amostra, com intuito de assegurar a validade do método e do modelo, respectivamente. [138]

Em grande parte, os resultados observados neste estudo foram ratificados por plausibilidade biológica. Por exemplo, a IL-5, uma das principais citocinas do padrão Th2, é importante fator de crescimento hematopoiético e que desempenha papel crucial na maturação e sobrevivência de eosinófilos. [139] Com efeito, as concentrações de IL-5 do fluido nasal e do escarro induzido, como já mencionado, não apenas foram maiores em indivíduos asmáticos, como também demonstraram correlação positiva com a contagem de eosinófilos do escarro induzido. É interessante observar que, em relação a Eotaxina-1, apesar de exercer o recrutamento de eosinófilos, [140] observou-se apenas fraca correlação com a contagem de eosinófilos no escarro. Uma possível explicação para isso pode ser o fato de os participantes não terem sido submetidos a estímulo provocatório previamente à coleta das secreções. Com efeito, Semik-Orzech e colaboradores demonstraram uma relação temporal na atividade da Eotaxina desde uma ação menos importante nas fases imediatas até uma atuação mais marcante nas fases tardias do processo inflamatório, [141] o que não foi possível mensurar no presente estudo pois os participantes não foram submetidos a testes de provocação. Ainda, os asmáticos deste estudo, embora não estivessem utilizando corticóides inalatórios, faziam uso regular ou ocasional de  $\beta_2$ -agonistas e estes, por sua vez, podem inibir a Eotaxina-1 quando induzida pelo TNF- $\alpha$ . [142, 143] Além disso, na construção dos componentes principais a IP-10 do fluido nasal, curiosamente, apresentou uma tendência de agrupamento muito próxima a interleucinas de padrão específico Th2 — Eotaxina-1 e IL-5.

Sabidamente, a IP-10 pode estar presente em níveis elevados nos indivíduos asmáticos frente a condições de infecções respiratórias, [144] porém esse era um critério de exclusão dessa pesquisa. Mais recentemente, um estudo demonstrou que a IP-10 do escarro induzido em asmáticos é maior do que em indivíduos normais e esta diferença parece estar mais pronunciada em asmáticos com predomínio combinado de eosinófilos e neutrófilos no escarro induzido (escarro granulocítico misto). [145] É útil mencionar que os autores do estudo citado consideraram a contagem diferencial de células do escarro induzido utilizando como pontos de corte para eosinofilia e neutrofilia 2 e 40%, respectivamente. Vale ressaltar que os pontos de corte acima descritos são diferentes daqueles utilizados em nossa metodologia. Contudo, se aplicássemos os mesmos parâmetros nos resultados do presente estudo, obteríamos uma IP-10 do fluido nasal significativamente elevada em indivíduos com celularidade mista granulocítica no escarro induzido em relação a outros padrões de predomínio celular no escarro.

Esse estudo possui algumas limitações. Primeiramente, alguns valores embora detectáveis, situaram-se abaixo do limite de quantificação mediante a análise do *Luminex 200*<sup>®</sup>, sendo mais evidente para IL-5 de participantes normais, tanto no fluido nasal como no escarro induzido. De forma similar, em relação ao IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , foram observados resultados abaixo do limite de quantificação tanto em normais quanto em asmáticos. Tivemos a precaução de executar uma análise, em paralelo, das correlações excluindo os casos abaixo do limite de quantificação do método. Observamos que não houve diferença significativa quanto à intensidade das correlações entre os dois cenários (mantendo ou excluindo os valores abaixo do limite de quantificação) nas análises multivariadas. De fato, alguns autores atestam benefício mínimo em se restringir apenas à análise dos valores situados acima limite de quantificação, [146] inclusive em análises que envolvam muitas variáveis. [147] Assim, entendemos ter sido apropriada a manutenção dos elementos amostrais ou mesmo de variáveis na situação exposta, pois isso não ocasionaria impacto sobre as análises e, sobretudo, preservaria o tamanho da amostra. Quanto as características dos participantes, o número de indivíduos asmáticos do sexo feminino foi maior que o masculino (2:1), e esse achado pode refletir o aspecto epidemiológico da doença, cuja prevalência em mulheres comparada a homens é maior em indivíduos adultos. [148] Além disso, a média de idade em asmáticos foi menor comparada aos participantes normais (31,8 vs 43,1; p valor 0,005). Uma possível explicação para essa

disparidade está no fato de que os asmáticos incluídos no estudo serem livres de corticóides inalatórios ou orais, e isso pode ter influenciado na formação de uma amostra composta por doentes mais novos. Outra limitação diz respeito à não inclusão da medida da celularidade do fluido nasal, a exemplo do escarro induzido. Ao acrescentar dados sobre a contagem diferencial de células do fluido nasal, por exemplo com predomínio de eosinófilos ou neutrófilos, poderíamos tanto fortalecer as correlações já observadas, como estabelecer possíveis novas correlações. Atualmente, um dos meios mais utilizados para avaliar a celularidade nasal é a lavagem nasal, sendo oportuno o emprego desta medida em futuros estudos a partir da escolha da metodologia de coleta mais apropriada, [115, 116, 149] bem como do processamento do lavado. [150, 151] Esse estudo também não contemplou os biomarcadores do sangue periférico. Cabe ressaltar que na época do início desta pesquisa, a contagem de eosinófilos no escarro induzido havia demonstrado ser um parâmetro apropriado para a seleção dos indivíduos que poderiam se beneficiar com a terapia anti-IL-5. [133, 152] Apenas mais recentemente é que a eosinofilia do sangue periférico foi introduzida como parâmetro alternativo ao escarro induzido para a caracterização daqueles indivíduos que respondem a terapêutica anti-IL5 com melhora clínica com essa terapia. [153-155]

As aplicabilidades dos métodos de coleta de fluido nasal e escarro induzido por meio da MSA podem ser muitas, dentre elas a de caracterizar possíveis endótipos das principais doenças inflamatórias das vias aéreas. Tanto a asma como as rinosinusites são doenças de alta heterogeneidade. Por isso, características clínicas observáveis, como a resposta a terapias instituídas, a intensidade de sintomas, o início da doença, o perfil celular da inflamação, fatores desencadeantes, entre outras, podem ser complementadas com o estudo dos padrões moleculares inflamatórios que possibilitem o desvendar dos possíveis mecanismos fisiopatológicos das enfermidades — endótipos. Desde que, há mais de três décadas, a terapia anti-interleucina foi introduzida, [156] diversos anticorpos monoclonais têm sido desenvolvidos para o tratamento de uma variedade de enfermidades, incluindo as doenças inflamatórias das vias aéreas. [133, 157-161] Neste sentido, o conhecimento a respeito dos diferentes biomarcadores moleculares bem como a sua caracterização como variáveis preditoras de resposta a intervenções é crucial para que os estudos com novas terapias possam ser conduzidos, além da possibilidade de aperfeiçoamento de tratamentos já utilizados atualmente. Uma aplicação possível para esse método seria a identificação dos indivíduos com elevada concentração

de IL-5 no fluido nasal e a sua estratificação para intervenções com terapias por anticorpos monoclonais hoje existentes (Mepolizumabe, Reslizumabe e Benralizumabe). E futuramente, na prática clínica, a caracterização endotípica de cada paciente evidenciando o(s) biomarcadores(s) de maior relevância, aliada a informações sobre o fenótipo clínico e molecular — eosinofílico, neutrofilico, granulocítico misto ou paucigranulocítico — , permitiriam a utilização de terapias de alta precisão com menor efeitos colaterais.



## 8 CONCLUSÕES

O método de coleta de espécimes do fluido nasal e do escarro induzido por matriz sintética absorviva foi exequível, minimamente invasivo, tolerável, de rápida execução e possibilitou a detecção de biomarcadores moleculares sem prévia provocação alérgica em participantes normais e asmáticos sem uso de tratamento controlador. A validade do método pode ser assegurada por diversas formas. Primeiramente, foram demonstradas correlações positivas entre interleucinas do fluido nasal e do escarro induzido em ambos os grupos, e entre a interleucina IL-5 do fluido nasal e a concentração de eosinófilos do escarro induzido. Além disso, a análise multivariada de componentes principais permitiu a detecção de dois componentes principais, sendo o primeiro composto por interleucinas compatíveis com o padrão Th1 e Th17, e o segundo composto por interleucinas predominantemente do padrão Th2. Finalmente, a análise de regressão multivariada logística possibilitou a identificação de 2 interleucinas, IL-5 e IL-8, com características preditivas ao escarro eosinofílico.





## 9 IMPLICAÇÕES

O método de coleta por MSA permite, de forma rápida e não invasiva, o acesso ao perfil inflamatório molecular da via aérea superior, com a possibilidade de identificar possíveis endótipos de doenças inflamatórias das vias aéreas. Desta forma, estudos que envolvam intervenções, por exemplo com anticorpos monoclonais, poderiam dispor desta técnica para a seleção dos participantes com determinado padrão de concentração de um ou mais biomarcadores para a implementação de uma terapia específica.

Futuramente na prática clínica, a caracterização endotípica de cada paciente aliada a outras informações, como o fenótipo clínico e molecular, aprofundariam o entendimento sobre aspectos de predição de riscos e preventivos da doença, e norteariam a utilização de terapias de alta precisão com menor efeitos colaterais.

Estudos mais elaborados serão necessários para fundamentar a acurácia dessas observações.



## 10 REFERÊNCIAS

1. *Global Initiative for Asthma . Global strategy for asthma management and prevention. Updated 2016. Disponível em <http://ginasthma.org/2016-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>.*
2. Masoli, M., et al., *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report.* Allergy, 2004. **59**(5): p. 469-78.
3. To, T., et al., *Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey.* BMC Public Health, 2012. **12**: p. 204.
4. Pearce, N., et al., *Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).* Thorax, 2007. **62**(9): p. 758-66.
5. Sole, D., et al., *Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).* Rev Paul Pediatr, 2014. **32**(1): p. 114-25.
6. Sole, D., et al., *Changes in the prevalence of asthma and allergic diseases among Brazilian schoolchildren (13-14 years old): comparison between ISAAC Phases One and Three.* J Trop Pediatr, 2007. **53**(1): p. 13-21.
7. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios: Um panorama da saúde no Brasil - acesso e utilização de serviço, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde, 2008. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010. Disponível em: [Disponível em: \[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnad\\\_panorama\\\_saude\\\_brasil.pdf\]\(http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnad\_panorama\_saude\_brasil.pdf\).](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnad_panorama_saude_brasil.pdf)*
8. Menezes, A.M., et al., *Prevalence of asthma medical diagnosis among Brazilian adults: National Health Survey, 2013.* Rev Bras Epidemiol, 2015. **18 Suppl 2**: p. 204-213.
9. Fitzgerald, J.M., et al., *The GINA Asthma Challenge: reducing asthma hospitalisations.* Eur Respir J, 2011. **38**(5): p. 997-8.
10. Zafari, Z., et al., *Economic and health effect of full adherence to controller therapy in adults with uncontrolled asthma: a simulation study.* J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(4): p. 908-915 e3.
11. Stirbulov, R., et al., *Cost of severe asthma in Brazil - Systematic review.* J Asthma, 2016: p. 1063-70.

12. Togias, A., *Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(6): p. 1171-83; quiz 1184.
13. Cruz, A.A., *The 'united airways' require an holistic approach to management*. Allergy, 2005. **60**(7): p. 871-4.
14. Corren, J., A. Togias, and J. Bousquet, *Upper and lower respiratory disease*. Lung biology in health and disease ; v.181. 2003, New York: Marcel Dekker. xvii, 522.
15. Ramakrishnan, J.B., T.T. Kingdom, and V.R. Ramakrishnan, *Allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: their impact on lower airways*. Immunol Allergy Clin North Am, 2013. **33**(1): p. 45-60.
16. Bousquet, J., et al., *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen)*. Allergy, 2008. **63 Suppl 86**: p. 8-160.
17. Grossman, J., *One airway, one disease*. Chest, 1997. **111**(2 Suppl): p. 11S-16S.
18. Togias, A., *Mechanisms of nose-lung interaction*. Allergy, 1999. **54 Suppl 57**: p. 94-105.
19. Krouse, J.H., et al., *Asthma and the unified airway*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. **136**(5 Suppl): p. S75-106.
20. Bousquet, J., et al., *Characteristics of intermittent and persistent allergic rhinitis: DREAMS study group*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(6): p. 728-32.
21. Linneberg, A., et al., *The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population-based study. The Copenhagen Allergy Study*. Allergy, 2002. **57**(11): p. 1048-52.
22. Leynaert, B., et al., *Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(1): p. 86-93.
23. Downie, S.R., et al., *Association between nasal and bronchial symptoms in subjects with persistent allergic rhinitis*. Allergy, 2004. **59**(3): p. 320-6.
24. Guerra, S., et al., *Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(3): p. 419-25.
25. Leynaert, B., et al., *Epidemiologic evidence for asthma and rhinitis comorbidity*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(5 Suppl): p. S201-5.

26. Leynaert, B., et al., *Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(2 Pt 1): p. 301-4.
27. Shaaban, R., et al., *Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study*. Lancet, 2008. **372**(9643): p. 1049-57.
28. Price, D., et al., *Effect of a concomitant diagnosis of allergic rhinitis on asthma-related health care use by adults*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(3): p. 282-7.
29. Sazonov Kocevar, V., et al., *Association between allergic rhinitis and hospital resource use among asthmatic children in Norway*. Allergy, 2005. **60**(3): p. 338-42.
30. Thomas, M., et al., *Asthma-related health care resource use among asthmatic children with and without concomitant allergic rhinitis*. Pediatrics, 2005. **115**(1): p. 129-34.
31. Gaugris, S., V. Sazonov-Kocevar, and M. Thomas, *Burden of concomitant allergic rhinitis in adults with asthma*. J Asthma, 2006. **43**(1): p. 1-7.
32. Barood, F.M. and B.J. Canning, *Comparative Anatomy of the Nasal and Tracheal/Bronchial Airways*. Upper and Lower Respiratory Disease, ed. T.A. Corren J, Bousquet J. Vol. 181. 2003, NY: Marcel Dekker.
33. Togias, A. and W. H., *The Impact of Nasal Function and Dysfunction on the Lower Airways*. Upper and Lower Respiratory Disease, ed. T.A. Corren J, Bousquet J. Vol. 181. 2003, NY: Marcel Dekker.
34. Cingi, C., et al., *Nasobronchial interaction*. World J Clin Cases, 2015. **3**(6): p. 499-503.
35. Assanasen, P., et al., *Natural and induced allergic responses increase the ability of the nose to warm and humidify air*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(6): p. 1045-52.
36. Melvin, T.A. and M. Ramanathan, Jr., *Role of innate immunity in the pathogenesis of allergic rhinitis*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2012. **20**(3): p. 194-8.
37. Zhang, N., et al., *Barrier function of the nasal mucosa in health and type-2 biased airway diseases*. Allergy, 2016. **71**(3): p. 295-307.
38. Groneberg, D.A., et al., *Distribution of respiratory mucin proteins in human nasal mucosa*. Laryngoscope, 2003. **113**(3): p. 520-4.
39. Voynow, J.A., S.J. Gendler, and M.C. Rose, *Regulation of mucin genes in chronic inflammatory airway diseases*. Am J Respir Cell

- Mol Biol, 2006. **34**(6): p. 661-5.
40. Braunstahl, G.J., et al., *Segmental bronchial provocation induces nasal inflammation in allergic rhinitis patients*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(6): p. 2051-7.
  41. Braunstahl, G.J., et al., *Segmental bronchoprovocation in allergic rhinitis patients affects mast cell and basophil numbers in nasal and bronchial mucosa*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(5): p. 858-65.
  42. Bonay, M., et al., *Changes in airway inflammation following nasal allergic challenge in patients with seasonal rhinitis*. Allergy, 2006. **61**(1): p. 111-8.
  43. Braunstahl, G.J., et al., *Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(3): p. 469-76.
  44. Braunstahl, G.J. and P.W. Hellings, *Allergic rhinitis and asthma: the link further unraveled*. Curr Opin Pulm Med, 2003. **9**(1): p. 46-51.
  45. Watson, W.T., A.B. Becker, and F.E. Simons, *Treatment of allergic rhinitis with intranasal corticosteroids in patients with mild asthma: effect on lower airway responsiveness*. J Allergy Clin Immunol, 1993. **91**(1 Pt 1): p. 97-101.
  46. Foresi, A., et al., *Once daily intranasal fluticasone propionate (200 micrograms) reduces nasal symptoms and inflammation but also attenuates the increase in bronchial responsiveness during the pollen season in allergic rhinitis*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(2): p. 274-82.
  47. Nair, A., et al., *Steroid sparing effects of intranasal corticosteroids in asthma and allergic rhinitis*. Allergy, 2010. **65**(3): p. 359-67.
  48. Agondi, R.C., et al., *Intranasal corticosteroid administration reduces nonspecific bronchial hyperresponsiveness and improves asthma symptoms*. J Asthma, 2008. **45**(9): p. 754-7.
  49. Stelmach, R., et al., *Effect of treating allergic rhinitis with corticosteroids in patients with mild-to-moderate persistent asthma*. Chest, 2005. **128**(5): p. 3140-7.
  50. Henriksen, J.M. and A. Wenzel, *Effect of an intranasally administered corticosteroid (budesonide) on nasal obstruction, mouth breathing, and asthma*. Am Rev Respir Dis, 1984. **130**(6): p. 1014-8.
  51. Thio, B.J., et al., *Influence of intranasal steroids during the grass pollen season on bronchial responsiveness in children and young adults with asthma and hay fever*. Thorax, 2000. **55**(10): p. 826-32.

52. Dahl, R., et al., *Intranasal and inhaled fluticasone propionate for pollen-induced rhinitis and asthma*. Allergy, 2005. **60**(7): p. 875-81.
53. Lohia, S., R.J. Schlosser, and Z.M. Soler, *Impact of intranasal corticosteroids on asthma outcomes in allergic rhinitis: a meta-analysis*. Allergy, 2013. **68**(5): p. 569-79.
54. Crystal-Peters, J., et al., *Treating allergic rhinitis in patients with comorbid asthma: the risk of asthma-related hospitalizations and emergency department visits*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(1): p. 57-62.
55. Corren, J., et al., *Rhinitis therapy and the prevention of hospital care for asthma: a case-control study*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 415-9.
56. Hafner, B., et al., *Endonasal sinus surgery improves mucociliary transport in severe chronic sinusitis*. Am J Rhinol, 1997. **11**(4): p. 271-4.
57. Kidwai, S.M., et al., *Improved delivery of sinus irrigations after middle turbinate resection during endoscopic sinus surgery*. Int Forum Allergy Rhinol, 2016.
58. Dhong, H.J., et al., *Effect of endoscopic sinus surgery on asthmatic patients with chronic rhinosinusitis*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2001. **124**(1): p. 99-104.
59. Ikeda, K., et al., *Endoscopic sinus surgery improves pulmonary function in patients with asthma associated with chronic sinusitis*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1999. **108**(4): p. 355-9.
60. Senior, B.A., et al., *Long-term impact of functional endoscopic sinus surgery on asthma*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1999. **121**(1): p. 66-8.
61. McLeod, R.S., *Issues in surgical randomized controlled trials*. World J Surg, 1999. **23**(12): p. 1210-4.
62. Ragab, S., et al., *Treatment of chronic rhinosinusitis and its effects on asthma*. Eur Respir J, 2006. **28**(1): p. 68-74.
63. Bousquet, J., et al., *Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1720-45.
64. Vignola, A.M., et al., *Airway remodeling in asthma*. Chest, 2003. **123**(3 Suppl): p. 417S-22S.
65. Corren, J. and A. Togias, *Remodeling in Allergic Rhinitis. Adding New Data to an Old Debate*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(12): p. 1403-4.
66. Salib, R.J. and P.H. Howarth, *Remodelling of the upper airways in*



- allergic rhinitis: is it a feature of the disease?* Clin Exp Allergy, 2003. **33**(12): p. 1629-33.
67. Nagata, H., et al., *Enhancement of submicroscopic damage of the nasal epithelium by topical allergen challenge in patients with perennial nasal allergy.* Ann Otol Rhinol Laryngol, 2001. **110**(3): p. 236-42.
  68. Montero Mora, P., et al., *[Nasal remodeling in patient with perennial allergic rhinitis].* Rev Alerg Mex, 2003. **50**(3): p. 79-82.
  69. Braunstahl, G.J., et al., *Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways.* Clin Exp Allergy, 2003. **33**(5): p. 579-87.
  70. Eifan, A.O., et al., *Severe Persistent Allergic Rhinitis. Inflammation but No Histologic Features of Structural Upper Airway Remodeling.* Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(12): p. 1431-9.
  71. Agache, I., et al., *Untangling asthma phenotypes and endotypes.* Allergy, 2012. **67**(7): p. 835-46.
  72. Lotvall, J., et al., *Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(2): p. 355-60.
  73. Williams, C.M., et al., *Cytokine pathways in allergic disease.* Toxicol Pathol, 2012. **40**(2): p. 205-15.
  74. Fahy, J.V., *Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many.* Nat Rev Immunol, 2015. **15**(1): p. 57-65.
  75. Turato, G., et al., *Nonatopic children with multitrigger wheezing have airway pathology comparable to atopic asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(5): p. 476-82.
  76. Knudsen, T.B., et al., *A population-based clinical study of allergic and non-allergic asthma.* J Asthma, 2009. **46**(1): p. 91-4.
  77. Castro-Rodriguez, J.A., et al., *Clinical, functional, and epidemiological differences between atopic and nonatopic asthmatic children from a tertiary care hospital in a developing country.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2007. **98**(3): p. 239-44.
  78. Tang, M.L., J. Coleman, and A.S. Kemp, *Interleukin-4 and interferon-gamma production in atopic and non-atopic children with asthma.* Clin Exp Allergy, 1995. **25**(6): p. 515-21.
  79. Barnes, P.J., *Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens?* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(8): p. 1145-51.

80. Moore, W.C., et al., *Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(4): p. 315-23.
81. Douwes, J., et al., *Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms*. Thorax, 2002. **57**(7): p. 643-8.
82. Drews, A.C., et al., *Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children*. Allergy, 2009. **64**(11): p. 1597-601.
83. Barnes, P.J., *Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 183-92.
84. Agache, I., et al., *Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma*. Respir Med, 2010. **104**(8): p. 1131-7.
85. Busse, W.W., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(11): p. 1294-302.
86. Szczeklik, A., E. Nizankowska, and M. Duplaga, *Natural history of aspirin-induced asthma*. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. Eur Respir J, 2000. **16**(3): p. 432-6.
87. Kowalski, M.L. and J.S. Makowska, *Seven steps to the diagnosis of NSAIDs hypersensitivity: how to apply a new classification in real practice?* Allergy Asthma Immunol Res, 2015. **7**(4): p. 312-20.
88. Nizankowska-Mogilnicka, E., et al., *EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity*. Allergy, 2007. **62**(10): p. 1111-8.
89. Muraro, A., et al., *Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(5): p. 1347-58.
90. Agache, I., et al., *The Complex Type 2 Endotype in Allergy and Asthma: From Laboratory to Bedside*. Curr Allergy Asthma Rep, 2015. **15**(6): p. 29.
91. Baines, K.J., et al., *Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(4): p. 997-1007.
92. Peters, M.C., et al., *Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 388-94.
93. Pene, J., et al., *Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes*. J Immunol, 2008.

- 180**(11): p. 7423-30.
94. Brozek, J.L., et al., *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(3): p. 466-76.
  95. Hellings, P.W., et al., *Uncontrolled allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: where do we stand today?* Allergy, 2013. **68**(1): p. 1-7.
  96. Papadopoulos, N.G., et al., *Phenotypes and endotypes of rhinitis and their impact on management: a PRACTALL report*. Allergy, 2015. **70**(5): p. 474-94.
  97. Hox, V., et al., *Occupational upper airway disease: how work affects the nose*. Allergy, 2014. **69**(3): p. 282-91.
  98. Wang, M., et al., *Immunomodulatory effects of IL-23 and IL-17 in a mouse model of allergic rhinitis*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(8): p. 956-66.
  99. Van Bruaene, N., et al., *TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(2): p. 253-9, 259 e1-2.
  100. Li, X., et al., *Expression of TGF, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors in Chinese chronic rhinosinusitis*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(5): p. 1061-8.
  101. Patadia, M., et al., *Evaluation of the presence of B-cell attractant chemokines in chronic rhinosinusitis*. Am J Rhinol Allergy, 2010. **24**(1): p. 11-6.
  102. Zhang, N., et al., *Remodeling and inflammation in Chinese versus white patients with chronic rhinosinusitis*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2): p. 507; author reply 507-8.
  103. Bachert, C., et al., *Specific IgE against Staphylococcus aureus enterotoxins: an independent risk factor for asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(2): p. 376-81 e8.
  104. Jeffery, P.K., *Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma*. Thorax, 1998. **53**(2): p. 129-36.
  105. Fokkens, W.J., et al., *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012*. Rhinol Suppl, 2012(23): p. 3 p preceding table of contents, 1-298.
  106. Bickerman, H.A., E.E. Sproul, and A.L. Barach, *An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer*. Dis Chest, 1958. **33**(4): p. 347-62.
  107. Leigh, T.R., et al., *Sputum induction for diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia*. Lancet, 1989. **2**(8656): p. 205-6.

108. Gibson, P.G., et al., *Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis*. Thorax, 1989. **44**(9): p. 693-9.
109. Pin, I., et al., *Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma*. Thorax, 1992. **47**(1): p. 25-9.
110. Hargreave FE, P.E., Pizzichini MMM, *Assessment of airway inflammation*. Asthma, ed. G.M. Barnes P, Leff A, Woolcock A Vol. 2. 1997, Philadelphia PA: Lippincott-Raven
111. Pizzichini E, P.M., Hargreave FE, *Induced sputum in the management of asthma*. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 1998. **19**: p. 581-92.
112. 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, 1996. **154**(2 Pt 1): p. 308-17.
113. Pizzichini, M.M., et al., *Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(5): p. 1501-8.
114. Howarth, P.H., et al., *Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3 Suppl 1): p. S414-41.
115. Naclerio, R.M., et al., *Mediator release after nasal airway challenge with allergen*. Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(4): p. 597-602.
116. Greiff, L., et al., *The 'nasal pool' device applies controlled concentrations of solutes on human nasal airway mucosa and samples its surface exudations/secretions*. Clin Exp Allergy, 1990. **20**(3): p. 253-9.
117. Fujimoto, C., et al., *Evaluation of nasal IgA secretion in normal subjects by nasal spray and aspiration*. Auris Nasus Larynx, 2009. **36**(3): p. 300-4.
118. Melillo, G., et al., *Ultrasonic nebulization of hypertonic solution: a new method for obtaining specimens from nasal mucosa for morphologic and biochemical analysis in allergic rhinitis*. Allergy, 1998. **53**(8): p. 794-7.
119. Walsh, E.E. and A.R. Falsey, *A simple and reproducible method for collecting nasal secretions in frail elderly adults, for measurement of virus-specific IgA*. J Infect Dis, 1999. **179**(5): p. 1268-73.
120. Watelet, J.B., et al., *Collection of nasal secretions for immunological analysis*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2004. **261**(5):

- p. 242-6.
121. Lu, F.X. and R.E. Esch, *Novel nasal secretion collection method for the analysis of allergen specific antibodies and inflammatory biomarkers*. J Immunol Methods, 2010. **356**(1-2): p. 6-17.
  122. Linden, M., et al., *Circulating eosinophil/basophil progenitors and nasal mucosal cytokines in seasonal allergic rhinitis*. Allergy, 1999. **54**(3): p. 212-9.
  123. Knowles, G.K., P. Townsend, and M. Turner-Warwick, *A standardized filter paper technique for assessing nasal secretory activity*. Clin Allergy, 1981. **11**(3): p. 287-92.
  124. Alam, R., et al., *Development of a new technique for recovery of cytokines from inflammatory sites in situ*. J Immunol Methods, 1992. **155**(1): p. 25-9.
  125. Erin, E.M., et al., *Topical corticosteroid inhibits interleukin-4, -5 and -13 in nasal secretions following allergen challenge*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(12): p. 1608-14.
  126. Bensch, G.W., H.S. Nelson, and L.C. Borish, *Evaluation of cytokines in nasal secretions after nasal antigen challenge: lack of influence of antihistamines*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. **88**(5): p. 457-62.
  127. Chawes, B.L., et al., *A novel method for assessing unchallenged levels of mediators in nasal epithelial lining fluid*. J Allergy Clin Immunol, 2010.
  128. Scadding, G.W., et al., *Optimisation of grass pollen nasal allergen challenge for assessment of clinical and immunological outcomes*. J Immunol Methods, 2012. **384**(1-2): p. 25-32.
  129. Folsgaard, N.V., et al., *Neonatal cytokine profile in the airway mucosal lining fluid is skewed by maternal atopy*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(3): p. 275-80.
  130. Scadding, G.W., et al., *Effect of grass pollen immunotherapy on clinical and local immune response to nasal allergen challenge*. Allergy, 2015. **70**(6): p. 689-96.
  131. Leckie, M.J., et al., *Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response*. Lancet, 2000. **356**(9248): p. 2144-8.
  132. Flood-Page, P., et al., *A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(11): p. 1062-71.
  133. Nair, P., et al., *Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia*. N Engl J Med, 2009. **360**(10): p. 985-93.
  134. Hulley, S.B., et al., *Designing clinical research : an epidemiologic*

- approach. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. Appendix 6C, page 79.
135. Standardization of spirometry--1987 update. Statement of the American Thoracic Society. Am Rev Respir Dis, 1987. **136**(5): p. 1285-98.
  136. Pepsys, J., *Skin tests in diagnosis*. In: Gell PH, Coombs RD, Lachman PJ. (eds): *Clinical aspects of immunology*. Third edition. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1975, 55-80.
  137. Green, R.H., et al., *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial*. Lancet, 2002. **360**(9347): p. 1715-21.
  138. Hair, J.A., et al., *Análise Multivariada de Dados*. 5 ed. 1998. v, 266.
  139. Rosenberg, H.F., K.D. Dyer, and P.S. Foster, *Eosinophils: changing perspectives in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 9-22.
  140. Upadhyaya, B., et al., *Hierarchical IL-5 expression defines a subpopulation of highly differentiated human Th2 cells*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3111-20.
  141. Semik-Orzech, A., et al., *Eotaxin, but not IL-8, is increased in upper and lower airways of allergic rhinitis subjects after nasal allergen challenge*. Allergy Asthma Proc, 2011. **32**(3): p. 230-8.
  142. Pang, L. and A.J. Knox, *Regulation of TNF-alpha-induced eotaxin release from cultured human airway smooth muscle cells by beta2-agonists and corticosteroids*. FASEB J, 2001. **15**(1): p. 261-269.
  143. Nie, M., A.J. Knox, and L. Pang, *beta2-Adrenoceptor agonists, like glucocorticoids, repress eotaxin gene transcription by selective inhibition of histone H4 acetylation*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 478-86.
  144. Wark, P.A., et al., *IFN-gamma-induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(3): p. 586-93.
  145. Takaku, Y., et al., *CXC chemokine superfamily induced by Interferon-gamma in asthma: a cross-sectional observational study*. Asthma Res Pract, 2016. **2**: p. 6.
  146. *What should be done with results below the detection limit? Mentioning the unmentionable*. Analytical Methods Committee technical brief No 5 Apr 2001. Royal Society of Chemistry 2001
  147. Hair, J.A., et al., *Análise Multivariada de Dados*. 5 ed. 1998. ii, 70.
  148. Moorman, J.E., et al., *Current asthma prevalence - United States, 2006-2008*. MMWR Suppl, 2011. **60**(1): p. 84-6.

149. Grunberg, K., et al., *Effect of experimental rhinovirus 16 colds on airway hyperresponsiveness to histamine and interleukin-8 in nasal lavage in asthmatic subjects in vivo*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(1): p. 36-45.
150. Belda, J., et al., *Repeatability and validity of cell and fluid-phase measurements in nasal fluid: a comparison of two methods of nasal lavage*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(7): p. 1111-5.
151. Bascom, R., et al., *The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. Effect of systemic steroid pretreatment*. Am Rev Respir Dis, 1988. **138**(2): p. 406-12.
152. Haldar, P., et al., *Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma*. N Engl J Med, 2009. **360**(10): p. 973-84.
153. Pavord, I.D., et al., *Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2012. **380**(9842): p. 651-9.
154. Katz, L.E., et al., *Blood eosinophil count is a useful biomarker to identify patients with severe eosinophilic asthma*. Ann Am Thorac Soc, 2014. **11**(4): p. 531-6.
155. Ortega, H.G., et al., *Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma*. N Engl J Med, 2014. **371**(13): p. 1198-207.
156. Skurkovich, S.V., et al., *Immunosuppressive effect of an anti-interferon serum*. Nature, 1974. **247**(5442): p. 551-2.
157. Normansell, R., et al., *Omalizumab for asthma in adults and children*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(1): p. CD003559.
158. Castro, M., et al., *Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(10): p. 1125-32.
159. Castro, M., et al., *Benralizumab, an anti-interleukin 5 receptor alpha monoclonal antibody, versus placebo for uncontrolled eosinophilic asthma: a phase 2b randomised dose-ranging study*. Lancet Respir Med, 2014. **2**(11): p. 879-90.
160. Wenzel, S., et al., *Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels*. N Engl J Med, 2013. **368**(26): p. 2455-66.
161. Gauvreau, G.M., et al., *Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses*. N Engl J Med, 2014. **370**(22): p. 2102-10.

## 11 APÊNDICES

### 11.1 Apêndice A – Artigo original

Jornal Brasileiro de Pneumologia



#### QUEBEC SLEEP QUESTIONNAIRE (QSQ) SOBRE QUALIDADE DE VIDA NA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO: TRADUÇÃO E ADAPTAÇÃO CULTURAL PARA USO NO BRASIL

Journal:	<i>Jornal Brasileiro de Pneumologia</i>
Manuscript ID	JBPNEU-2016-0160.R1
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	

SCHOLARONE™  
Manuscripts



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## INTRODUÇÃO

A apneia obstrutiva do sono (AOS) pode ser definida por cinco ou mais episódios por hora de eventos respiratórios predominantemente obstrutivos durante o exame de polissonografia. Esses eventos devem estar associados a sinais e sintomas como ronco intenso, sonolência diurna, despertares súbitos com sensação de sufocamento e apneias observadas por outrem. Alternativamente, uma frequência de eventos respiratórios obstrutivos acima de 15/h satisfaz o critério diagnóstico mesmo na ausência de sinais e sintomas (1).

Esta condição representa mais de 85% de todas as causas de distúrbios respiratórios relacionados ao sono (2). Em um estudo de base populacional conduzido na cidade de São Paulo, a prevalência da AOS foi de 32,8% (3), trazendo à tona a magnitude desse problema. Quanto ao impacto financeiro, estima-se em 3,4 bilhões de dólares o custo anual nos Estados Unidos apenas para o tratamento de problemas médicos oriundos da AOS (4).

Estudos têm demonstrado uma estreita relação entre a AOS e a hipertensão arterial sistêmica (5), as alterações no metabolismo da glicose (6), as doenças cardiovasculares (7) bem como as respiratórias, como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (8). Além disso, sonolência excessiva diurna, fadiga, irritabilidade e alterações de personalidade também têm sido atribuídas às dessaturações da oxihemoglobina intermitentes, assim como à privação de sono crônica derivada da fragmentação do mesmo (9).

Todas essas alterações podem levar a uma diminuição da qualidade de vida. Enquanto existe por parte dos estudos uma supervalorização do índice de apneia e hipopneia (IAH) como medida de desfecho, curiosamente, um aspecto ainda pouco mencionado é o efeito da AOS na qualidade de vida. Entretanto, existe uma fraca correlação entre a qualidade de vida relatada pelos pacientes e o IAH, tornando inadequado o uso isolado deste desfecho (10). Por isso, parece razoável que a mensuração da qualidade de vida por meio de um questionário específico possa ser considerada, o que permitiria a sua utilização em estudos epidemiológicos de diferentes regiões e em ensaios clínicos. Além disso, a aplicação do instrumento possibilitaria uma análise mais fidedigna dos efeitos em curto, médio e longo prazo, uma vez instituído um determinado tratamento. Para isso, são necessários questionários devidamente validados, como o *Quebec Sleep Questionnaire* (QSQ), que figura entre os principais

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

instrumentos voltados à avaliação da qualidade de vida em pacientes com AOS. Até o momento, nenhum instrumento específico para a avaliação da qualidade de vida em pacientes com AOS foi elaborado ou adaptado para o Brasil. Portanto, o presente estudo tem como objetivos a tradução e a adaptação cultural do QSQ para a língua portuguesa falada no Brasil.

## MÉTODOS

### DESCRIÇÃO DO QSQ

O QSQ (11) é um instrumento composto por 32 itens que avaliam o impacto da apneia em cinco domínios distintos: sonolência diurna, sintomas diurnos, sintomas noturnos, emoções e interações sociais. Cada domínio compõe-se de 4 a 10 itens pontuados em uma escala do tipo *Likert* de 1 a 7 pontos. Os resultados são apresentados como a pontuação média de cada domínio separadamente. Escores mais altos refletem sintomas mais brandos. Os itens correspondentes cada domínio são:

- **Sonolência Diurna:** 7, 16, 20, 27, 31, 32.
- **Sintomas diurnos:** 1, 10, 11, 14, 17, 18, 19, 23, 26, 29.
- **Sintomas noturnos:** 4, 9, 21, 22, 25, 28, 30.
- **Emoções:** 5, 6, 8, 15, 24.
- **Interações sociais:** 2, 3, 12, 13.

O item 32, que faz referência ao ato de dirigir automóveis, deverá ser deixado em branco caso o paciente não dirija, sendo a média do domínio "sonolência diurna" calculada a partir dos cinco itens restantes.

### DELINEAMENTO

Este é um estudo metodológico que envolveu a tradução e a adaptação cultural do QSQ para a língua portuguesa falada no Brasil. As etapas percorridas para o processo de adaptação cultural, que também podem ser encontradas em outras publicações (12-14), foram executadas rigorosamente conforme sugestões internacionalmente aceitas (15) e serão resumidas a seguir: 1) Preparação: reunião entre os pesquisadores para traçar os planos de trabalho e obtenção da autorização para o uso do QSQ contatando o idealizador do mesmo; 2) Tradução: conduzidas três traduções do QSQ a partir da língua inglesa para a língua portuguesa por três profissionais da área da

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

saúde, de forma independente; 3) Reconciliação: reconciliação entre os tradutores para a formulação de única versão na língua portuguesa; 4) Retradução: tradução reversa da versão única reconciliada para o inglês; 5) Comparação e harmonização da retradução: comparação, conduzida pelos autores, da retradução com a versão original do QSQ para a detecção de possíveis discrepâncias; 6) Revisão da versão em português do QSQ por especialistas; 7) Desdobramento cognitivo: consiste no processo de testar a compreensão do questionário traduzido na população alvo. Foram entrevistados 25 participantes de ambos os sexos, alfabetizados, com idade superior a 18 anos, com suspeita diagnóstica de AOS – ronco noturno, apneias presenciadas, sonolência excessiva diurna - atendidos em consultas externas e com indicação clínica de estudo polissonográfico. O diagnóstico de AOS foi posteriormente confirmado por meio da polissonografia basal quando o IAH foi igual ou superior a 15 ou quando o IAH  $\geq 5$  em pacientes que referiam outros sintomas, tais como sensação de despertar sufocados, sonolência diurna, cansaço, alterações cognitivas, sono fragmentado ou não reparador (16). Os pacientes foram primeiramente convidados a preencher o QSQ propriamente dito. Como o QSQ é um questionário autoaplicável, o mesmo foi preenchido pelos próprios participantes sem o auxílio do médico assistente. Em seguida, um outro instrumento com a finalidade de avaliar o desdobramento cognitivo do QSQ foi conduzido. Nessa etapa, os participantes foram informados de que deveriam mostrar o quanto compreenderam de cada uma das 32 perguntas respondidas previamente. Um registro sobre o entendimento de cada item era graduado, pelos próprios participantes, em escala do tipo *Likert*, em notas de 1 a 10. Conceituou-se que escores entre 1 e 4 indicariam um enunciado confuso, entre 5 e 7 um enunciado pouco claro e, entre 8 e 10 um enunciado claro (17). O índice de clareza de cada item foi obtido por meio da média das notas atribuídas pelos pacientes. Os itens cujas médias não atingissem o índice 0,4 deveriam ser substituídos. Os itens cujas médias não atingissem o índice 0,8 deveriam ser reformulados. Finalmente, os itens que apresentassem a média do índice final igual ou maior que 0,8 eram considerados adequados quanto ao seu entendimento e mantidos. 8) A revisão do texto foi a etapa conduzida por uma professora de língua portuguesa e dedicada à revisão do corpo textual; 9) Versão Final: elaboração da versão final do questionário sintoma-específico para avaliação da qualidade de vida em pacientes com apneia do sono. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e conduzido de acordo com os princípios éticos.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

A análise estatística foi descritiva utilizada na caracterização demográfica e clínica dos participantes e os resultados expressos como média e desvio padrão.

## RESULTADOS

Dos 25 pacientes entrevistados para a etapa do desdobramento cognitivo, três foram excluídos por perda de seguimento. Dos 22 pacientes remanescentes, 16 eram do sexo masculino. A faixa etária variou de 26 a 65 anos. O índice de massa corporal (IMC) médio foi de 28,5, sendo  $29,0 \pm 5,0$  (média  $\pm$  DP) para homens e  $27,1 \pm 2,3$  para mulheres, enquanto as medidas de circunferência cervical foram para homens e mulheres, respectivamente,  $40,6 \pm 3,4$  cm e  $36,0 \pm 1,41$  cm. Quanto aos achados da polissonografia, pôde-se observar que o IAH variou de 0 a 89,7 ( $23,4 \pm 26,7$ ). (Tabela 1)

As etapas de tradução e retradução do QSQ não suscitaram dúvidas ou correções. A revisão realizada pelo comitê de especialistas não apontou erros gramaticais e/ou conceituais. Da mesma forma, não foram observadas dificuldades na tradução e adaptação de palavras referentes aos domínios, porém algumas expressões idiomáticas da língua inglesa foram motivo de revisão e discussão. Por exemplo, na etapa da comparação entre a versão retraduzida e a original, dois itens foram questionados pelo autor do QSQ por apresentarem distanciamento do conceito inicial: 1) O item 23, que se distanciou da versão original em inglês, mas que o autor concordou com a adaptação cultural, pois foi a tradução mais fidedigna da versão original em francês. Portanto, “*Feeling that you lack energy*” na retradução apresentou-se como: “*Feeling that you are exhausted (worn-out)*” e aceita pelo autor; 2) a graduação da Escala de Likert dos itens 10 a 15: na retradução foi apresentada ao autor a escala: “*Excessively – Often – Moderately to often – Moderately – A little – Barely – Not at all*”. O autor explicou que estas alternativas expressavam *quantidade e tempo* e ele preferia a escala que expressasse apenas *quantidade* (como na versão franco-canadense original); Desta forma, a mudança para a escala de Likert foi realizada como a seguir: “uma quantidade muito grande - uma grande quantidade - de moderada a grande quantidade - uma quantidade moderada - uma pequena quantidade moderada - uma pequena quantidade - nenhum”.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Após a aprovação pelo autor da versão retraduzida já modificada, um comitê de especialistas reuniu-se para avaliar a versão da língua portuguesa do questionário, com o objetivo de detectar erros, emitir sugestões e avaliar o seu conteúdo e estrutura. A revisão realizada pelo comitê de especialistas não apontou erros gramaticais e/ou conceituais. Correções gramaticais foram efetuadas também pela especialista em português e o questionário para a aplicação no desdobramento cognitivo foi então confeccionado.

O desdobramento cognitivo (*debriefing*) foi realizado item a item, a fim de assegurar que toda a tradução fosse de fácil compreensão. O instrumento foi revisado discutindo-se os achados das respostas e não houve a necessidade de reformulação de itens, com escores mínimo de 0,81 e máximo de 0,99 (Figura 1). Assim, a versão após o desdobramento foi aceita, sem modificações, depois de alcançada concordância plena por todos os pesquisadores (Anexo 1).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, foi adaptado culturalmente para o Brasil um instrumento específico para medir a qualidade de vida em pacientes com AOS, o QSQ. O resultado do desdobramento cognitivo revelou que o instrumento apresenta grau adequado de compreensibilidade em todos os itens. Este achado é de grande relevância, pois sinaliza a consistência dos processos de tradução e adaptação cultural. Todavia, embora todos os itens tenham ultrapassado o índice de clareza de 0,8, ao atentarmos para o desempenho alcançado pelo item 13 – “*Você tem se sentido culpado em seu relacionamento com familiares ou amigos íntimos?*” – observamos que este item apresentou a menor média de pontuação entre todos os outros (0,81). Entendemos que, mais do que a dificuldade de entendimento pelos pacientes, este achado pode ter refletido o teor essencialmente subjetivo da questão.

A adaptação cultural de um questionário deve englobar não apenas a tradução conceitualmente equivalente ao instrumento original como também culturalmente aceitável ao país no qual o questionário será utilizado. Por isso, o presente estudo foi conduzido de acordo com as orientações da literatura(15, 18) visando alcançar as equivalências técnica e semântica entre as duas versões. Ao garantir essas

1  
2  
3 equivalências, evita-se que distorções possam comprometer as propriedades  
4 psicométricas já devidamente documentadas em estudos anteriores (19).

5  
6 Um dos questionários de qualidade de vida genéricos mais comumente utilizado  
7 é o SF-36, que se encontra adaptado em língua portuguesa (20) e já aplicado em estudos  
8 com a AOS (21). Todavia, se por um lado o uso de ferramentas genéricas facilita a  
9 comparação com outras doenças crônicas, por outro não avalia os aspectos específicos  
10 mais importantes de uma determinada doença para o paciente (22). Além disso, os  
11 instrumentos genéricos podem não ter a capacidade de detectar os efeitos de  
12 intervenções ou tratamentos (23).

13  
14 A nossa opção pelo QSQ ocorreu por se tratar de um questionário específico,  
15 validado, de fácil preenchimento, estruturado em diferentes domínios e por ser  
16 autoaplicável. Ademais, o QSQ apresenta a característica de responsividade às  
17 alterações produzidas por intervenções terapêuticas (24). Concebido originalmente em  
18 francês por Lacasse et al. em 2002, o QSQ também foi desenvolvido para o  
19 inglês e foi demonstrada excelente qualidade psicométrica (11). Naquela ocasião,  
20 também foi determinada a mínima diferença clinicamente importante para cada  
21 domínio, quais sejam, 1,8 para a sonolência diurna, 2,0 para os sintomas diurnos, 1,5  
22 para sintomas noturnos, 1,1 para emoções e 2,5 para interações sociais. Posteriormente,  
23 o QSQ foi traduzido e adaptado para o espanhol (25) e teve as suas propriedades  
24 psicométricas também devidamente asseguradas (26). Em comparação a outros  
25 instrumentos também específicos para a AOS, como o SAQLI (*Sleep Apnea Quality of*  
26 *Life Instrument*) (27), devem ser observadas algumas características que tornam o QSQ  
27 vantajoso. Dentre essas podemos destacar o maior trabalho exigido durante o  
28 preenchimento do SAQLI (56 questões), a necessidade da aplicação do mesmo por meio  
29 do entrevistador e, sobretudo, a possibilidade de interferência do paciente para graduar  
30 o constructo de “sintomas” (28). Em contrapartida, o QSQ é mais curto e possui itens  
31 padronizados, o que o torna mais apropriado para estudos amplos e de longo prazo (29).  
32 Outro instrumento específico amplamente utilizado em pesquisas e na prática clínica é o  
33 *Epworth Sleepiness Scale* (30-31). Contudo, este não é um questionário direcionado à  
34 mensuração da qualidade de vida e detem-se especificamente ao domínio “sonolência”.  
35 Mais recentemente, em uma revisão sistemática que analisou diversos questionários  
36 voltados para o uso em pacientes com AOS (32), o QSQ foi um dos que recebeu  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

destaque para a avaliação na prática clínica de pacientes com SAOS, notadamente por sua validade de conteúdo.

Quando às limitações do QSQ admitimos que, por ser um instrumento específico e padronizado, possa haver restrição das escolhas individuais de alguns pacientes e, portanto, alterar a acurácia do instrumento no tocante a sua responsividade após a implementação de um tratamento. Já no que diz respeito ao delineamento do estudo, pode-se questionar a opção em termos mantido pacientes com queixas de ronco, sono não reparador, entre outras, porém com o IAH  $< 5$ . Quanto a isso, estamos cientes de que a AOS é uma doença capaz de atingir os pacientes em diferentes dimensões, como a sonolência, a cognição, a fisiologia cardiovascular e a qualidade de vida. Com efeito, julgamos necessário o aprofundamento do debate em torno da inclusão de outras medidas, além do IAH, para o diagnóstico, estratificação de gravidade e orientação terapêutica da AOS.

Buscar conferir valor àquilo que os pacientes nos reportam sobre a sua doença e qualidade de vida é fundamental. Ao mensurar os diversos domínios afetados pela doença, o nosso conhecimento passa a ser enriquecido por um dado objetivo o que outrora era essencialmente subjetivo e muitas vezes omitido em consultas médicas e nos estudos. *Sir William Thomson (1824-1907)*, renomado cientista também conhecido como *Lord Kelvin*, expunha com grande propriedade: "se você não for capaz medir algo e expressá-lo em números, o seu conhecimento sobre isso será insuficiente".

Desta forma, o QSQ encontra-se traduzido e adaptado para a língua portuguesa falada no Brasil. Neste sentido, consideramos que uma futura utilização do QSQ estudos epidemiológicos multicêntricos de diversas regiões poderia permitir a comparação de resultados e estimar em que grau as diferenças socioculturais influenciam o impacto que a SAOS ocasiona na qualidade de vida das populações. Vale ressaltar que o QSQ é um instrumento único de avaliação de qualidade de vida relacionada à apneia obstrutiva do sono em língua portuguesa falada no Brasil

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao idealizador do Quebec Sleep Questionnaire, Dr. Y Lacasse, pela receptividade e participação nas etapas necessárias a este projeto. Agradecemos também ao Dr. Luciano Nogueira pela valiosa participação na etapa inicial de tradução.



## REFERÊNCIAS

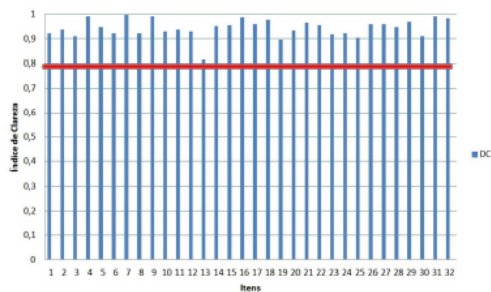
1. American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders. 3rd ed. Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine; 2014.
2. Morgenthaler TI, Kagramanov V, Hanak V, Decker PA. Complex sleep apnea syndrome: is it a unique clinical syndrome? *Sleep*. 2006;29(9):1203-9.
3. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bitencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med*. 2010; 11(5):441-6.
4. Kapur V, Blough DK, Sandblom RE, Hirt R, de Maine JB, Sullivan SD, et al. The medical cost of undiagnosed sleep apnea. *Sleep*. 1999;22(6):749-55.
5. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med*. 2000; 342(19):1378-84.
6. Punjabi NM, Polotsky VY. Disorders of glucose metabolism in sleep apnea. *J Appl Physiol*. 2005;99(5):1998-2007.
7. Peker Y, Carlson J, Hedner J. Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *Eur Respir J*. 2006;28(3):596-602.
8. Ioachimescu OC, Teodorescu M. Integrating the overlap of obstructive lung disease and obstructive sleep apnoea: OLDOSA syndrome. *Respirology*. 2013;18(3):421-31.
9. Colt HG, Haas H, Rich GB. Hypoxemia vs sleep fragmentation as cause of excessive daytime sleepiness in obstructive sleep apnea. *Chest*. 1991;100(6):1542-8.
10. Tam S, Woodson BT, Rotenberg B. Outcome measurements in obstructive sleep apnea: beyond the apnea-hypopnea index. *Laryngoscope*. 2014;124(1):337-43.
11. Lacasse Y, Bureau MP, Series F. A new standardised and self-administered quality of life questionnaire specific to obstructive sleep apnoea. *Thorax*. 2004 ;59(6):494-9.
12. Felisbino MB, Steidle LJ, Goncalves-Tavares M, Pizzichini MM, Pizzichini E. Leicester Cough Questionnaire: translation to Portuguese and cross-cultural adaptation for use in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2014;40(3):213-21.
13. Tavares MG, Pizzichini MM, Steidle LJ, Nazario NO, Rocha CC, Perraro MC, et al. The Asthma Control Scoring System: translation and cross-cultural adaptation for use in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2010;36(6):683-92.
14. Caminha GP, Melo Junior JT, Hopkins C, Pizzichini E, Pizzichini MM. SNOT-22: psychometric properties and cross-cultural adaptation into the Portuguese language spoken in Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78(6):34-9.
15. Wild D, Grove A, Martin M, Eremenco S, McElroy S, Verjee-Lorenz A, et al. Principles of Good Practice for the Translation and Cultural Adaptation Process for Patient-Reported Outcomes (PRO) Measures: report of the ISPOR Task Force for Translation and Cultural Adaptation. *Value Health*. 2005;8(2):94-104.
16. American Academy of Sleep Medicine. The international classification of sleep disorders : diagnostic and coding manual. 2nd ed. Westchester, Ill.: American Academy of Sleep Medicine; 2005.
17. Melo SIL. Coeficiente de atrito: um sistema de avaliação. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; Projeto de Tese, 1994. p.94-99. 153 p.
18. Guillemin F, Bombardier C, Beaton D. Cross-cultural adaptation of health-related quality of life measures: literature review and proposed guidelines. *J Clin Epidemiol*. 1993;46(12):1417-32.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

19. Reichenheim ME, Moraes CL. [Operationalizing the cross-cultural adaptation of epidemiological measurement instruments]. *Rev Saude Publica*. 2007 Aug;41(4):665-73.
20. Laguardia J, Campos MR, Travassos CM, Najar AL, Anjos LA, Vasconcelos MM. Psychometric evaluation of the SF-36 (v.2) questionnaire in a probability sample of Brazilian households: results of the survey Pesquisa Dimensoes Sociais das Desigualdades (PDSO), Brazil, 2008. *Health Qual Life Outcomes*. 2011;9:61.
21. Ackel-D'Elia C, da Silva AC, Silva RS, Truksinas E, Sousa BS, Tufik S, et al. Effects of exercise training associated with continuous positive airway pressure treatment in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath*. 2011 Jul 30.
22. Hopkins C. Patient reported outcome measures in rhinology. *Rhinology*. 2009 Mar;47(1):10-7.
23. Hopkins C, Gillett S, Slack R, Lund VJ, Browne JP. Psychometric validity of the 22-item Sinusnasal Outcome Test. *Clin Otolaryngol*. 2009 Oct;34(5):447-54.
24. Randerath WJ, Sanner BM, Somers VK. *Sleep apnea : current diagnosis and treatment*. Basel ; New York: Karger; 2006.
25. Herrejon A, Martinez A, Peris R, Inchaurrega I, Fernandez E, Blanquer R. [Translation and adaptation to Spanish language of the quality of life questionnaire for sleep apnea-hypopnea syndrome Quebec Sleep Questionnaire]. *Med Clin (Barc)*. 2012 May 5;138(12):519-21.
26. Catalan P, Martinez A, Herrejon A, Chiner E, Martinez-Garcia MA, Sancho-Chust JN, et al. Internal consistency and validity of the Spanish version of the "Quebec Sleep Questionnaire" quality-of-life questionnaire for obstructive sleep apnea. *Arch Bronconeumol*. 2012 Apr;48(4):107-13.
27. Flemons WW, Reimer MA. Development of a disease-specific health-related quality of life questionnaire for sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Aug;158(2):494-503.
28. Lacasse Y, Godbout C, Series F. Independent validation of the Sleep Apnoea Quality of Life Index. *Thorax*. 2002 Jun;57(6):483-8.
29. Juniper EF, Buist AS, Cox FM, Ferrie PJ, King DR. Validation of a standardized version of the Asthma Quality of Life Questionnaire. *Chest*. 1999 May;115(5):1265-70.
30. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991 Dec;14(6):540-5.
31. Bertolazi AN, Fagundes SC, Hoff LS, Pedro VD, Menna Barreto SS, Johns MW. Portuguese-language version of the Epworth sleepiness scale: validation for use in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2009 Sep;35(9):877-83.
32. Abma IL, van der Wees PJ, Veer V, Westert GP, Rovers M. Measurement properties of patient-reported outcome measures (PROMs) in adults with obstructive sleep apnea (OSA): A systematic review. *Sleep Med Rev*. 2015 Aug 7;28:14-27.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Figura 1 - Determinação de Clareza do "QSQ"**

DC: Desdobramento cognitivo.

Mostra o índice de clareza de cada item do "QSQ". As barras em cor azul representam o índice de clareza no desdobramento cognitivo. A linha em vermelho mostra o ponto de corte de 0,80 a partir do qual um item é considerado claro. A figura mostra que todos os itens do "QSQ" foram considerados claros no desdobramento cognitivo.

Determinação de Clareza do OSQ

Figura 1

183x135mm (144 x 144 DPI)

**Tabela 1:** Distribuição dos pacientes segundo características demográficas e dados polissonográficos

Características	Resultados
Idade anos*	44,68 (10,75)
Sexo masculino, n (%)	16 (72,7%)
Escolaridade $\leq$ ensino médio, n (%)	5 (22,7%)
Índice de massa corporal*	28,5 (4,4)
Circunferência cervical*	39,3 (3,6)
IAH*	23,4 (26,7)
Índice de despertares*	27,5 (13,5)

\* média (= desvio padrão)

## **11.2 Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PARTICIPANTE**

**TÍTULO: “VALIDADE E PROPRIEDADES DISCRIMINATIVAS DAS MEDIDAS DE CITOCINAS NO FLUIDO NASAL OBTIDAS POR DIFUSÃO COMPARADAS ÀS MEDIDAS DAS MESMAS NA FASE LÍQUIDA DO ESCARRO INDUZIDO”.**

#### **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 só deve participar deste estudo se desejar. 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 asma, bronquite causada pelo cigarro (DPOC) ou por não ter nenhuma doença respiratória crônica e não fumar. O objetivo deste estudo é determinar as características da inflamação no escarro e no líquido que reveste o seu nariz. Com isto, pretendemos aprender se as informações destes dois métodos são similares.

O método da indução de escarro já vem sendo utilizado por médicos e pesquisadores para o diagnóstico e tratamento de doenças das vias aéreas e dos pulmões há alguns anos. Porque o revestimento do nariz e das vias aéreas inferiores (brônquios) é parecido, uma alternativa seria obter o líquido que reveste o nariz e ver se oferece as mesmas informações. Com a obtenção destes parâmetros poderíamos dispor de dois métodos para estudar a inflamação em diversas doenças que afetam as vias aéreas como a asma, a bronquite, a tosse crônica, dentre outras.

#### **DESCRIÇÃO DO ESTUDO:**

Este é um estudo que envolverá cerca de 40 pessoas com idade superior a 18 anos. Sua participação no estudo consistirá em uma ou

duas visitas ao centro de estudo, quando será realizado um questionário sobre sintomas respiratórios, assim como alguns exames complementares para comprovar que você tem asma, bronquite causada pelo cigarro ou não tem nenhuma doença respiratória. Se estes testes confirmarem isto, você será submetido então à indução do escarro, que é uma forma de induzir a produção de uma pequena quantidade de secreção das vias aéreas (escarro) para a posterior análise de suas células sob o microscópio. Além disso, nós examinaremos o seu nariz e colocaremos um pequeno papel (3 x 7 mm) para absorver o líquido que reveste a superfície do nariz. Este procedimento é simples e indolor.

### **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 testes ou procedimentos.
- Revisão das suas condições médicas atuais e passadas, incluindo o uso de quaisquer medicamentos.
- Exame físico, incluindo aferição de peso e altura.
- Espirometria: teste respiratório que requer que você respire em um tubo ligado a uma máquina que mede quanto ar você tem nos pulmões e sua capacidade de soprar o ar para fora.
- Indução do escarro.
- Teste alérgico cutâneo.
- Exame do seu nariz e colocação de um pequeno filtro de papel.

### **RISCOS E DESCONFORTOS:**

Os testes a que você será submetido são procedimentos padronizados e utilizados corriqueiramente na prática médica, e em geral se associam com riscos insignificantes. O teste da metacolina e da inalação da solução salina podem causar sintomas leves de aperto no peito, chiado ou tosse. Estes sintomas desaparecem rapidamente após o uso de um medicamento broncodilatador. Além disso, a inalação de solução salina para induzir o escarro pode ter gosto desagradável e provocar leve irritação na garganta, que desaparece logo após o teste. O teste de alergia é realizado na pele e, se for positivo, pode provocar

coceira, inchaço e vermelhidão no local, como se fosse uma mordida de pernilongo. O exame do nariz é feito com um aparelho chamado espelho nasal e pode causar um discreto desconforto no local.

Para a realização do questionário clínico e dos testes acima descritos (em uma ou duas visitas de acordo com suas necessidades), será necessário que você permaneça no centro do estudo por um período total de até 3 (três) horas . 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 deste hospital. 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 médicos do estudo ou o pessoal do estudo responderão quaisquer perguntas que você tiver sobre este estudo e sobre os resultados dos testes que serão realizados. Entre em contato sempre que tiver qualquer dúvida sobre o estudo ou sua participação no mesmo.

**MÉDICOS DO ESTUDO:** Dr. José Tavares de Melo Junior

**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: 3234-7711

## **CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo **“VALIDADE E PROPRIEDADES DISCRIMINATIVAS DAS MEDIDAS DE CITOCINAS NO FLUIDO NASAL OBTIDAS POR DIFUSÃO COMPARADAS ÀS MEDIDAS DAS MESMAS NA FASE LÍQUIDA DO ESCARRO INDUZIDO”**.

Eu discuti com o Dr. José Tavares de Melo Junior sobre minha decisão em participar neste estudo. Está claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação neste estudo é voluntária e isenta de despesas.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste serviço.

### **Paciente:**

Nome do Paciente:

---

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do Paciente

---

**OBS: Leve para casa, uma cópia deste termo assinado pelo seu médico**

**Médico**

Declaro que esclareci todos os propósitos do estudo, solucionei todas as dúvidas do paciente e obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Nome do médico:

---

—  
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do médico

---



## 12 ANEXO

### 12.1 Anexo A – Aprovação pelo Comitê de Ética



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARNA**  
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO – TRINDADE CEP: 88040-900 – FLORIANÓPOLIS – SC  
 TELEFONE (048) 234-1755 – FAX (048) 234-4069

#### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS – CEP / UFSC PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº 013/08

##### I – IDENTIFICAÇÃO

**Título do projeto:** Validade e propriedades discriminatórias da medida de citocinas inflamatórias no fluido nasal obtido por difusão comparada às medidas de citocina na fase líquida do escarro induzido.

**Área:** Ciências da Saúde – Medicina – Diag.

**Pesquisador Responsável:** Dra. Márcia M. M. Pizzichini

**Pesquisador Principal:** Dra. Márcia M. M. Pizzichini

**Data da coleta dos dados:** março de 2008 a setembro de 2008

**Instituição em que será realizado o estudo:** Hospital Universitário HU/UFSC.

##### II – OBJETIVOS

Investigar o padrão de resposta inflamatória no fluido nasal e na fase líquida do escarro induzido de pacientes com asma não controlada;

Investigar o padrão de resposta inflamatória no fluido nasal e na fase líquida do escarro induzido de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) moderada à grave sem uso de corticosteróides inalatórios;

Correlacionar o perfil da resposta inflamatória medida no fluido nasal e na fase líquida do escarro induzido em cada grupo de indivíduos;

Determinar o poder discriminatório do padrão de resposta inflamatória no fluido nasal e na fase líquida do escarro induzido de pacientes com asma não controlada (Grupo I) ou DPOC (Grupo II) com aquele de indivíduos hígidos (Grupo III).

##### III – SUMÁRIO DO PROJETO:

Trata-se de um estudo não intervencional, transversal e descritivo abrangendo 30 indivíduos maiores de 18 anos e que sejam capazes de produzir escarro induzido, divididos em 3 grupos: grupo I: pacientes com asma não controlada; grupo II pacientes com DPOC e grupo III: pacientes hígidos. Serão realizados procedimentos (testes diagnósticos) de anamnese direcionada, questionário de controle de asma, espirometria, teste de broncoprovocação por metacolina, teste alérgico cutâneo, indução de escarro, exame do escarro induzido e obtenção do fluido nasal por papel filtro. Todos os resultados serão analisados por meio de análise estatística.

##### IV – COMENTÁRIO:

A pesquisa proposta tem relevância científica. O tema faz parte da linha de atuação do pesquisador. O protocolo da pesquisa contém os documentos necessários para sua análise e exigidos pela legislação. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) encontra-se convenientemente redigido.

##### V – PARECER CEP:

**Aprovado**

##### PARECER:

Tendo em vista o exposto, somos de parecer favorável à aprovação do referido projeto.

**\*Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado, em reunião deste Comitê na data de 10 de março de 2008.**