**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**
**FACULDADE DE MEDICINA**
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA**

# CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E FENOTÍPICAS DE ASMA GRAVE RESISTENTE À TERAPIA EM CRIANÇAS BRASILEIRAS

**ANDREA MENDONÇA RODRIGUES**

**Porto Alegre, 2015**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**
**FACULDADE DE MEDICINA**
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA**

# CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E FENOTÍPICAS DE ASMA GRAVE RESISTENTE À TERAPIA EM CRIANÇAS BRASILEIRAS

**ANDREA MENDONÇA RODRIGUES**

Tese de Doutorado em Pediatria do Curso de Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS como parte dos requisitos a obtenção do título de Doutora em Medicina/Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

**Porto Alegre, 2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

R696c Rodrigues, Andrea Mendonça

Características clínicas e fenotípicas de asma grave resistente à terapia em crianças brasileiras / Andrea Mendonça Rodrigues. - Porto Alegre: PUCRS, 2015.

66 f.: il. gráf. tab. Inclui dois artigos científicos a serem submetidos à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança. Doutorado em Pediatria.

1. ASMA/genética. 2. ASMA/epidemiologia. 3. ASMA/diagnóstico. 4. PERFIL DE IMPACTO DA DOENÇA. 5. QUALIDADE DE VIDA. 6. CRIANÇA. 7. PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO. 8. CENTROS DE SAÚDE. 9. SERVIÇOS BÁSICOS DE SAÚDE. 10. BRASIL/epidemiologia. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Título.

C.D.D. 618.9223
N.L.M. WF 553

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

## AGRADECIMENTOS

Ao longo deste tempo em que passei no laboratório, convivendo com diferentes pessoas, muitas foram marcantes e ficarão na memória, principalmente pela dedicação e empenha à pesquisa.

Agradeço inicialmente a todos do Centro Infant da PUCRS por estarem sempre presentes, quando necessário, nas cirurgias, procedimentos e ainda respondendo aos meus questionamentos. Em especial, agradeço a Aline Cunha, Lucien Gualdi, Mauro Henrique Moraes Vargas, Nailê Nuñes e Rodrigo Godinho de Souza pela ajuda na realização do estudo sobre o lisado bacteriano e à Suelen Goecks, João Paulo Heinzmann Filho, além de novamente ao Rodrigo Godinho de Souza pela ajuda na realização dos escarros.

À todas as residentes da pneumologia pediátrica que ao longo destes 3 anos passaram pelo ambulatório de asma da PUCRS e me ajudaram no atendimento e coleta de dados dos pacientes.

À Giovana Santos, que com seu empenho esteve sempre junto aos paciente asmáticos graves, ajudando sempre nas orientações para conseguirem suas medicações, bem como, motivando-os para que nunca desistissem do tratamento e cobrando sempre suas frequencias nos ambulatórios.

Ao Cristian Roncada, pelo empenho e dedicação ao ambulatóro de pneumologia pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS com os pacientes asmáticos graves.

À Carla Rothmann que por tantas vezes me ajudou nesta jornada dupla de profissional e pesquisadora, com os pequenos imprevistos rotineiros.

À Rita Mattiello, pela grande ajuda em todas as dúvidas sobre análises estatísticas, sendo sempre muito atenciosa.

Aos pneumologistas pediátricos do serviço do Hospital São Lucas da PUCRS, em especial: Marcus Herbert Jones, Leonardo Araújo Pinto,Marcus Herbert Jones, Paulo José Cauduro Marostica e Renato Tetelbom Stein

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Paulo Pitrez, o qual sempre esteve presente me orientando com uma inabalável paciência durante a realização de meu doutorado, principalmente na fase final de redação da tese, sendo exemplo de professor e pesquisador dedicado.

Aos meus pais, Leila e Maurício, que, mesmo distantes, sempre me deram suporte emocional e me apoiaram em todas as minhas decisões, mesmo com os problemas de saúde

que os acometeram na reta final de minha caminhada. A eles o meu sempre muito obrigada por tudo e a desculpa de não estar sempre presente.

À minha irmã Adriana, excelente ouvinte, quando necessitei, e que teve um papel essencial no suporte aos meus pais enquanto estava distante.

À todas minhas amigas, que sempre compreenderam minhas ausências.

À Deus, fazer tudo isto possível.

E, ao final, um agradecimento mais que especial ao meu querido e amado noivo, Felippe Lehugeur, que participou de todos os momentos desta caminhada comigo, superando dificuldades e vencendo desafios, me dando suporte emocional e me incentivando sempre.

## RESUMO

**Introdução:** estudos de crianças com asma grave resistente à terapia (AGRT) são escassos em países desenvolvidos e não há dados publicados sobre apresentação clínica e características desses pacientes em países em desenvolvimento.

**Objetivo:** descrever as principais características clínicas, funcionais, radiológicas e de inflamação no escarro induzido de crianças com AGRT, provenientes de um centro de referência do sul do Brasil.

**Métodos:** foram selecionadas retrospectivamente crianças entre 6-14 anos, acompanhadas por pelo menos 6 meses em um centro de referência do sul do Brasil, com diagnóstico AGRT (asma não controlada, usando doses elevadas de corticoide inalatório associado a beta-2 agonista de ação longa). A partir de dados coletados prospectivamente no seguimento clínico, foram analisados controle da doença, função pulmonar, teste cutâneo para aeroalérgenos, avaliação da inflamação no escarro induzido, tomografia de tórax, e phmetria.

**Resultados:** 21 pacientes foram selecionados (média de 9,2 anos). Dezoito (86%) pacientes são atópicos. A maioria dos pacientes apresenta pouco controle da doença, com função pulmonar basal sempre próxima do normal. Dois pacientes apresentaram escarro paucigranulocítico, 4 eosinofílico e 7 neutrofílico, onde 67% que repetiram o exame apresentaram mudança no padrão inflamatório. 6/7 (86%) pacientes que utilizaram omalizumabe (anti-IgE) apresentaram melhora importante da qualidade de vida, com redução importante das exacerbações.

**Conclusões:** crianças com AGRT apresentam doença difícil de controlar, função pulmonar próxima do normal e padrão inflamatório das vias aéreas variável durante seguimento clínico, sendo em sua maioria atópicas. Esse perfil, diferente dos adultos, precisa ser melhor entendido em relação aos mecanismos que resultam em sintomas não responsivos a terapias medicamentosas otimizadas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Studies of children with severe therapy-resistant asthma are scarce in developed countries and there is no published data about clinical presentations and characteristics of these patients in developing countries.

**Objective:** To describe the main clinical characteristics, lung function, radiological findings, and inflammation of induced sputum of children with severe therapy-resistant asthma from a reference center in southern Brazil.

**Methods:** Children between 6-14 years of age, followed by at least 6 months in a reference center, with severe therapy-resistant asthma (uncontrolled asthma using elevated doses of inhaled corticoid associated with long-acting beta-2 agonist) were retrospectively selected. All subjects from the reference center had clinical data, disease control, lung function, skin test reactivity to aeroallergens, inflammation of induced sputum, chest computerized tomography, and pH esophageal monitoring results prospectively collected.

**Results:** 21 patients were selected (mean age: 9.2 yo). Eighteen patients (86%) were atopic. Most patients presented uncontrolled disease during most visits, with nearly normal baseline lung function parameters. The sputum of two patients were paucigranulocytic, 4 were eosinophilic and 7 neutrophilic, where 67% of the children who repeated sputum exam changed the inflammatory patterns. 6/7 (86%) of the children who were treated with omalizumab (anti-IgE) showed improvement in quality of life, with an important reduction in exacerbations and hospitalizations.

**Conclusions:** Most children with severe therapy-resistant asthma from a non-affluent population were patients with difficult-to-control disease, with nearly normal lung function and prone to change airway inflammatory pattern during follow-up, most of them atopics. This profile, unlike adults, need to be better understood in relation to the mechanisms that result in symptoms unresponsive to optimized drug therapies.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Figura 1. Protocolo utilizado para indução de resposta pulmonar alérgica aguda em camundongos BALB/c e uso precoce de OM-85 ..... 28

Figura 2. Comparação da contagem total e diferencial no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados na Fase I. ..... 32

Figura 3. Comparação da contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados na Fase II. ..... 33

Figura 4. Níveis de IL-4 no lavado broncoalveolar (LBA) e de IgE específica séricos para ovalbumina (OVA) entre os grupos estudados ..... 33

Figura 5. Resistência das vias aéreas medida por impedância com o método de oscilação forçada. ..... 34

Figura 6. Comparação histológica entre os grupos. ..... 35

### CAPÍTULO III

Figura 1. Percentual de testes cutâneos positivos nas crianças com asma grave resistente à terapia e distribuição da positividade em relação aos tipos de alergenos testados .. 51

Figura 2. Comparação da função pulmonar de crianças com asma grave resistente à terapia no início da avaliação clínica e após otimização do tratamento no centro de referência (variáveis expressas em escore Z do valor de referência do Global Lungs Initiative; n=21). ..... 51

Figura 3. Taxa de sucesso de obtenção de escarro induzido e distribuição dos padrões de inflamação nas vias aéreas inferiores das crianças estudadas com AGRT ..... 52

Figura 5. A) Mediana de escores do Asthma Control test (ACT) em visitas médicas consecutivas de pacientes com asma grave resistente à terapia. B) Freqüencia de episódios de doença não controlada (ACT<20) e controlada (ACT≥20) em crianças com asma grave resistente à terapia ..... 53

## LISTA DAS TABELAS

### CAPÍTULO II

**Tabela 1**. Grupos do estudo de acordo com a fase e dose de OM-85 recebida .....27

### CAPÍTULO III

**Tabela 1-** Características das crianças com asma grave resistente à terapia.....50

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| AGRT | Asma grave resistente à terapia |
| ATS | *American Thoracic Society* |
| ACT | *Asthma Control Test* |
| CD | *Cluster of differentiation* |
| CI | Corticóide Inalatório |
| CTC | Contagem total de células |
| CVF | Capacidade Vital Forçada |
| DPBS | *Dulbecco´s phospate buffered saline* |
| DTT | Dithiothreitol |
| EPO | Peroxidase eosinofílica |
| ERS | *European Respiratory Society* |
| FC | Fragmento de Ig facilmente cristalizado |
| $FEF_{25-75\%}$ | Fluxo Expiratório Forçado 25-75% tempo |
| GINA | *Global Initiative for Asthma* |
| GLI | *Global Lungs Initiative* |
| HE | *Hematoxilina-eosina* |
| *HIV* | *Human Immunodeficiency Virus* |
| IFN | Interferon |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IL | Interleucina |
| IN | Intranasal |
| IPI | *International Pharmaceutical Immunology* |
| LBA | Lavado broncoalveolar |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| OM-85 | Lisado bacteriano |
| OVA | Ovalbumina |
| RGE | Refluxo gastro-esofágico |
| RPM | Rotações por minuto |
| SC | Subcutâneo |
| TCAR | Tomografia de Tórax Alta Resolução |
| Th1 | Linfócito T auxiliar do tipo 1 |

| | |
|---|---|
| Th2 | Linfócito T auxiliar do tipo 2 |
| Treg | Linfócito T regulador |
| VEF1 | Volume Expiratório Forçado no segundo1 |

**SUMÁRIO**

**CAPÍTULO I ..... 13**

1.1 INTRODUÇÃO ..... 14

1.2 JUSTIFICATIVA ..... 16

1.3 OBJETIVOS ..... 18

1.4 REFERÊNCIAS ..... 19

**CAPÍTULO II ..... 21**

2.1 ARTIGO ORIGINAL 1 ..... 22

**CAPÍTULO III ..... 40**

3.1 ART IGO ORIGINAL 2 ..... 41

**CAPÍTULO IV ..... 60**

4.1 CONCLUSÕES ..... 61

**ANEXOS ..... 63**

**ANEXO 1- APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA** ..... 64

# CAPÍTULO I

## 1.1 INTRODUÇÃO

Durante o último ano de minha residência médica decidi que iria me envolver nas atividades do grupo de Pneumologia Pediátrica da PUCRS e aprender um pouco mais sobre pesquisa científica. Conversei então com meus preceptores e obtive um estímulo muito positivo do Prof. Dr. Paulo Márcio Pitrez, meu então orientador de mestrado e agora doutorado, fiz a inscrição para seleção de Mestrado no Curso de Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS e, obtendo êxito na seleção, comecei a cursá-lo ainda no meu último semestre da residência. Tive então meus primeiro contatos com camundongos, aprendi a manuseá-los, as diferentes técnicas cirúrgicas e ainda a utilizar alguns instrumentos do laboratório, obtendo conhecimentos novos muito instigantes para mim.

Em meu trabalho de mestrado provamos que a eficiência de um protocolo de indução de resposta inflamatória eosinofílica pulmonar alérgica em camundongos BALB/c mais curto (10 dias), utilizado em estudos de asma, era semelhante ao protocolo antigo em que necessitávamos de 28 dias, o que resultaria em menos tempo para testar novas terapias em asma. Mostramos também que a utilização de ovalbumina (OVA) por via subcutânea (SC) era semelhante à utilização de ovalbumina intraperitoneal utilizando alum como adjuvante no modelo murino de asma (o alum potencializa artificialmente a resposta imune e a produção de citocinas de característica alérgica), tornando este modelo menos artificial.

Seguindo a mesma linha de pesquisa em modelos murinos, iniciei meu doutorado pesquisando um lisado bacteriano, o OM-85, que compreende uma mistura de proteínas ácidas, peptídeos e aminoácidos, além de componentes menores de lipopolissacarídeos e ácido lipoteicóico, extraídos de oito bactérias patogênicas comuns ao trato respiratório superior: *Haemophilus influenzae, Diplococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae e ozaenae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes e viridans*, *Neisseria catarrhalis*. O OM-85 tem sido utilizado no mundo há cerca de 20 anos para reduzir o número de infecções respiratórias agudas em adultos e crianças, através de potenciais atividades imunomoduladoras. Nossa pesquisa tinha como objetivo verificar se o OM-85 inibe a resposta inflamatória pulmonar alérgica em camundongos.

Ao mesmo tempo, desde o final de minha residência, continuei acompanhando o Ambulatório de Asma Infantil do HSL/PUCRS com o Prof. Pitrez, onde lidamos rotineiramente com pacientes asmáticos e com os desafios do seu tratamento. Em uma das

consultas nos chamou atenção o fato de um dos nossos pacientes ter apresentado um quadro de asma quase fatal, o que, juntamente com o caso de alguns pacientes asmáticos muito graves, o levou a iniciar o primeiro Ambulatório de Asma de Difícil Controle (ADC) do Hospital São Lucas da PUCRS. Assim, fomos buscar mais conhecimentos na literatura e na prática, visitando Centros de referência em adultos e crianças. O Prof. Pitrez visitou a UFMG em Belo Horizonte, onde há um centro muito conceituado no tratamento de crianças com ADC, e eu fui à Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Pavilhão Pereira Filho, para aprender como os pneumologistas adultos diagnosticavam e tratavam a ADC. Findado este período de estudos, iniciamos nosso protocolo de atendimento, com divulgação do Centro, recebendo crianças da rede pública e de outros colegas para tratamento. Iniciamos também um protocolo de indicação e aplicação de omalizumabe (anti-IgE) nas crianças com ADC, nos tornando centro pioneiro no país para tratamento com esta nova terapia em asma grave na criança. O ambulatório infantil de ADC da PUCRS é hoje um centro de referência, recebendo visitas de médicos especialistas do Brasil e América Latina para replicarem nosso protocolo. Assim, este tema tornou-se parte central do meu doutorado, com identificação e descrição completa das principais alterações clínicas, funcionais, radiológicas e de marcadores inflamatórios, avaliando controle da doença e qualidade de vida destas crianças. Não encontramos dados brasileiros publicados sobre ADC em criança, nem mesmo em centros de pacientes em desenvolvimento.

Deste modo, em meu doutorado, meus trabalhos foram concentrados na realização de dois artigos originais, apresentados a seguir, em asma: o primeiro estudando o efeito do lisado bacteriano OM-85 na resposta inflamatória pulmonar alérgica em camundongos e o segundo sobre asma de difícil controle na criança, mostrando as características destes pacientes.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

### ARTIGO I

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores cujo tratamento central convencional é o corticoide inalatório de uso contínuo[1]. No entanto, não existe ainda nenhuma terapia ou fator protetor capaz de prevenir primariamente a doença no início da vida ou fármacos mais isentos de eventos adversos. Pro-bióticos[2-4], prevenção de infecções virais no início da vida[5,6] e exposição ambiental a produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS)[7]parecem reduzir o risco de desenvolvimento de asma.

O OM-85 é um lisado bacteriano, imunoestimulante, que compreende uma mistura de proteínas ácidas, peptídeos e aminoácidos, além de componentes menores de lipopolissacarídeos e ácido lipoteicóico, extraídos de oito bactérias patogênicas comuns ao trato respiratório superior sendo utilizado no mundo há cerca de 20 anos para reduzir o número de infecções respiratórias agudas em adultos e crianças[8,9], expressando diversas atividades imunomodulatórias[10].

Alguns estudo demostraram a redução da resposta inflamatória $TH_2$ com o uso deste lisado, em doses extremamente elevadas do ponto de vista translacional, se pensarmos na equivalência de dose para humanos[9,11,12].

Com estes dados, como nosso grupo já havia publicado alguns trabalhos com o uso do OM-85, resolvemos organizar um estudo de forma a verificar se a resposta $TH_2$ era reduzida com o uso de doses convencionais deste lisado.

### ARTIGO II

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores que acomete cerca de 300 milhões de pessoas em todo mundo[1]. Atualmente, um dos fatores mais impactantes da asma é o importante comprometimento da qualidade vida do paciente[2,3] . A asma de difícil controle na criança representa o maior desafio clínico, com prevalência estimada em 0,5% da população escolar (aproximadamente 5% das crianças com asma)[4]. Crianças com asma de difícil controle apresentam exacerbações frequentes com sintomas diários, piorando, assim, sua qualidade de vida, com grande impacto em atendimento médico, perda escolar, hospitalizações e custos financeiros para a família e sociedade. A doença é caracterizada por sintomas contínuos, exacerbações e necessidade frequente de uso de beta-2 agonistas de curta

ação a despeito de uma dose diária de pelo menos 800μg de budesonida, por no mínimo 6 meses[5].

Dentro deste grupo de pacientes, a apresentação clínica mais delicada é a do paciente com asma grave resistente a terapia farmacológica (AGRT), que necessita de uma abordagem sistemática. Assim, crianças com AGRT, para realização deste diagnóstico, necessitam de uma avaliação sistemática para exclusão de outras doenças (fibrose cística, imunodeficiências, entre outras), e manejo de má técnica inalatória, má adesão ao tratamento, co-morbidades relevantes e fatores ambientais importantes[6]. Existem poucos trabalhos descrevendo especificamente as características clínicas de crianças com AGRT[7,8] e analisando em maior detalhe os mecanismos responsáveis por esta apresentação tão grave da doença[9,10,11]. Além disso, não existem estudos descrevendo a asma grave resistente à terapia em crianças de países em desenvolvimento, apesar de se saber que países de tamanho continental como o Brasil apresentam elevada prevalência de asma grave [12,13].

Visto o quadro apresentado, eu e meu orientador resolvemos dedicar um ambulatório específico para atendimento destes casos, tanto para otimizar o tratamento quanto para estudar as características destes nossos pacientes.

## 1.3 OBJETIVOS

### ARTIGO I

O objetivo deste artigo é avaliar especificamente a eficácia do lisado bacteriano OM-85 na prevenção de inflamação de vias aéreas em um modelo murino de inflamação eosinofílica de vias aéreas inferiores, realizando uma primeira fase com protocolos de dose-resposta, compatível com doses humano-equivalentes, com posterior teste de eficácia mais detalhado utilizando somente uma dose.

### ARTIGO II

O objetivo do estudo com pacientes com asma grave resistente à terapia é descrever as principais características fenotípicas, funcionais, radiológicas e de inflamação das vias aéreas de crianças e adolescentes com este diagnóstico, acompanhados em nosso ambulatório de asma no Hospital São Lucas da PUCRS.

## 1.4 REFERÊNCIAS

### ARTIGO I

1. Global strategy for asthma managment and prevention [database on the Internet]2009 [cited March 2014]. Available from: http://www.ginasthma.org.
2. Forsythe P. Probiotics and lung immune responses. Ann Am Thorac Soc. 2014 Jan;11 Suppl 1:S33-7.
3. Azad MB, Coneys JG, Kozyrskyj AL, Field CJ, Ramsey CD, Becker AB, et al. Probiotic supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2013;347:f6471.
4. Elazab N, Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Quizon A, Forno E. Probiotic administration in early life, atopy, and asthma: a meta-analysis of clinical trials. Pediatrics. 2013 Sep;132(3):e666-76.
5. Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma? J Allergy Clin Immunol. 2010 Jun;125(6):1202-5.
6. Jackson DJ. Early-life viral infections and the development of asthma: a target for asthma prevention? Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2014 Apr;14(2):131-6.
7. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. N Engl J Med. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Sep 19;347(12):869-77.
8. Huber M, Mossmann H, Bessler WG. Th1-orientated immunological properties of the bacterial extract OM-85-BV. Eur J Med Res. 2005 May 20;10(5):209-17.
9. Razi CH, Harmanci K, Abaci A, Ozdemir O, Hizli S, Renda R, et al. The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children. J Allergy Clin Immunol. 2010 Oct;126(4):763-9.
10. Strickland DH, Judd S, Thomas JA, Larcombe AN, Sly PD, Holt PG. Boosting airway T-regulatory cells by gastrointestinal stimulation as a strategy for asthma control. Mucosal Immunol. 2011 Jan;4(1):43-52.
11. Weinberger M. Can we prevent exacerbations of asthma caused by common cold viruses? J Allergy Clin Immunol. 2010 Oct;126(4):770-1.
12. Navarro S, Cossalter G, Chiavaroli C, Kanda A, Fleury S, Lazzari A, et al. The oral administration of bacterial extracts prevents asthma via the recruitment of regulatory T cells to the airways. Mucosal Immunol. 2011 Jan;4(1):53-65.

### ARTIGO II

1. From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). 2014. (Accessed at http://www.ginasthma.org/.)
2. Sullivan S, Rasouliyan L, Russo P, Kamath T, Chipps B. Extent, patterns, and burden of uncontrolled disease in severe or difficult‐to‐treat asthma. Allergy 2007;62:126-33.
3. Braman SS. The global burden of asthma. Chest 2006;130:4S-12S.
4. Lang A, Carlsen K, Haaland G, et al. Severe asthma in childhood: assessed in 10 year olds in a birth cohort study*. Allergy 2008;63:1054-60.

5. Hedlin G, Bush A, Carlsen KL, et al. Problematic severe asthma in children, not one problem but many: a GA2LEN initiative. European Respiratory Journal 2010;36:196-201.
6. Lodrup Carlsen KC, Hedlin G, Bush A, et al. Assessment of problematic severe asthma in children. Eur Respir J 2011;37:432-40.
7. Payne DN, Qiu Y, Zhu J, et al. Airway inflammation in children with difficult asthma: relationships with airflow limitation and persistent symptoms. Thorax 2004;59:862-9.
8. Bossley CJ, Saglani S, Kavanagh C, et al. Corticosteroid responsiveness and clinical characteristics in childhood difficult asthma. Eur Respir J 2009;34:1052-9.
9. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, et al. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines. J Allergy Clin Immunol 2012;129:974-82 e13.
10. Saglani S, Lui S, Ullmann N, et al. IL-33 promotes airway remodeling in pediatric patients with severe steroid-resistant asthma. J Allergy Clin Immunol 2013;132:676-85 e13.
11. Gupta A, Dimeloe S, Richards DF, et al. Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma. Thorax 2014;69:508-15.
12. Simoes SM, Cunha SS, Barreto ML, Cruz AA. Distribution of severity of asthma in childhood. J Pediatr (Rio J) 2010;86:417-23.
13. Lai CK, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Thorax 2009;64:476-83.

# CAPÍTULO II

## 2.1 ARTIGO ORIGINAL 1

**Título:** Extrato bacteriano com doses humano-equivalentes não inibe o desenvolvimento de asma em modelo murino.

**Title:** Bacterial extract with human-equivalent doses does not inhibit the development of asthma in a murine model.

**Autores:** Andrea Rodrigues, Lucien Perondi Gualdi, Rodrigo Godinho da Silva, Mauro Moraes Vargas, Nailê Nuñez, Aline Cunha, Marcus Herbert Jones, Leonardo Araújo Pinto, Renato Tetelbom Stein, Paulo Márcio Pitrez

**RESUMO**

**Introdução:** apesar do tratamento convencional, não existe ainda nenhuma terapia ou fator protetor capaz de prevenir primariamente a asma no início da vida. Pro-bióticos, prevenção de infecções virais no início da vida e exposição ambiental a produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS) parecem reduzir o risco de desenvolvimento de asma. O OM-85 é um lisado bacteriano, imunoestimulante, que tem se mostrado eficaz na redução do número de infecções em vias aéreas inferiores.

**Objetivo:** avaliar especificamente a eficácia do lisado bacteriano OM-85 na prevenção primária de asma de característica eosinofílica em um modelo murino.

**Métodos:** na primeira fase de nosso estudo 32 animais receberam doses de 0,5 μg, 5 μg e 50 μg de OM-85 (Paxoral®, Farmasa, Brasil), por gavagem, durante 5 dias (dias -10 a -6 do protocolo), 10 dias antes do início da sensibilização com ovalbumina (OVA), para avaliarmos os resultados dos protocolos de dose-resposta. Uma dose (5 μg) foi escolhida para verificarmos em maior detalhe o efeito do OM-85 sobre a resposta pulmonar alérgica. O experimento foi então repetido com grupos controle positivo e negativo (no total de 20 animais), sendo avaliados função pulmonar, contagem total/diferencial de células e citocinas no lavado broncoalveolar, IgE específica para OVA, e análise histopatológica.

**Resultados:** o OM-85 não reduziu a resposta pulmonar eosinofílica, quando comparado ao controle positivo, independente da dose utilizada. Na segunda fase, usando 5 μg/animal de OM-85, não encontramos também diferença de efeito do OM-85 na resposta pulmonar eosinofílica, de citocinas Th2/Th1 e IgE específica para OVA no LBA, nas alterações histopatológicas e na resistência das vias aéreas.

**Conclusões:** o OM-85, administrado no início da vida em camundongos, em doses humano-equivalentes, não inibe o desenvolvimento da resposta pulmonar alérgica em camundongos.

**Descritores:** OM-85, lisado bacetriano, asma, camundongo.

**ABSTRACT**

**Background:** Despite conventional treatment, there is no current therapy or protective factor that are able to primarily prevent asthma in early life. Probiotics, prevention of viral infections early in life and environmental exposure to bacterial products such as lipopolysaccharide (LPS) appear to reduce the risk of developing asthma. The OM-85 is an immunostimulant bacterial lysate, which has been proven effective in reducing the number of infections in the lower airways.

**Objective:** To assess the efficacy of the bacterial lysate OM-85 in primary prevention of a murine model of asthma.

**Methods:** in the first phase of our study the 32 animals received doses of 0.5 μg, 5 μg and 50 μg of OM-85 (Paxoral®, Farmasa, Brazil) by gavage for 5 days (days -10 to -6 of the protocol), 10 days prior to starting the sensitization with ovalbumin (OVA), in order to evaluate the results of dose-response protocols. In additional, a 5 μg dose was chosen in order to verify in detail the effect of OM-85 on the pulmonary allergic response. The experiment was then repeated with positive and negative control groups (20 animals), and lung function, total/differential cells and cytokines from bronchoalveolar lavage fluid, OVA-specific IgE levels from blood, and lung histopathological analysis were evaluated.

**Results:** OM-85 did not reduce pulmonary eosinophilic response, compared to the positive control group, regardless of the dose used. In the second phase, using 5 μg/animal of OM-85, we did not show any difference among the groups studied, including Th2/Th1 cytokines and OVA-specific IgE, lung histological findings and lung resistance.

**Conclusions:** OM-85, administered in early life in mice in human-equivalent doses, does not inhibit the development of allergic pulmonary response in mice.

**Key words:** OM-85, bacterial lysate, asthma, mice.

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores que acomete cerca de 300 milhões de pessoas em todo mundo, com elevada prevalência em crianças (10-30% da população). Uma vez estabelecida a doença, há inflamação crônica associada à hiperresponsividade brônquica, com sintomas de obstrução das vias aéreas inferiores, que respondem somente a tratamento contínuo anti-inflamatório (1).

O tratamento central convencional da asma é o corticoide inalatório de uso contínuo. Sua utilização, muitas vezes associada a outros fármacos, permite alcançar o controle da doença na maioria dos casos. No entanto, não existe ainda nenhuma terapia ou fator protetor capaz de prevenir primariamente a doença no início da vida ou fármacos mais isentos de eventos adversos. Pro-bióticos (2-4), prevenção de infecções virais no início da vida (5, 6) e exposição ambiental a produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS) (7) parecem reduzir o risco de desenvolvimento de asma.

O OM-85 é um lisado bacteriano, imunoestimulante, que compreende uma mistura de proteínas ácidas, peptídeos e aminoácidos, além de componentes menores de lipopolissacarídeos e ácido lipoteicóico, extraídos de oito bactérias patogênicas comuns ao trato respiratório superior: *Haemophilus influenzae, Diplococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae e ozaenae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes e viridans, Neisseria catarrhalis,* sendo utilizado no mundo há cerca de 20 anos para reduzir o número de infecções respiratórias agudas em adultos e crianças (8, 9), expressando diversas atividades imunomodulatórias (10). Em março de 2012, em uma revisão da Cochrane de 35 estudos placebo-controlados, Del-Rio-Navarro e col. demonstraram que 40% dos pacientes menores de 18 anos que fizeram uso de imunoestimulantes reduziram o número de infecções em vias aéreas inferiores quando comparados ao grupo placebo (11). Em 2010, Razi e col. partindo do princípio de que as infecções em vias aéreas inferiores são a principal causa de sibilância em crianças, e que o OM-85 pode reduzir o número destas infecções em 25-50%, publicou um estudo com 75 crianças sibilantes prévias entre 1 e 6 anos de vida, demonstrando redução de 37,8% nos episódios de sibilância (9, 12).

Somando-se os achados desses estudos ao conceito de "mucosa comum do sistema imune" (13), no qual a estimulação por um antígeno em uma mucosa leva à estimulação de uma resposta imune em outra mucosa distante, torna atraente a hipótese de que o OM-85 oferecido por via oral poderia modular o desenvolvimento de asma de origem alérgica.

Assim, Navarro et al. utilizaram um modelo murino de resposta $T_H2$ induzida por ovalbumina (OVA), onde demonstraram que o uso de OM-85 inibiu a hiperresponssividade brônquica, inflamação pulmonar, hipersecreção de muco, eosinofilia em vias aéreas, e produção de IgE antígeno-específica, reduzindo o número de células $T_H2$ inflamatórias, com redução de citocinas, e aumentando o número de células $T_{reg}$ na lâmina própria intestinal e na mucosa das vias aéreas. (14) Strickland et al. também demonstraram que o OM-85 por via oral pode estimular resposta de células $T_{reg}$ à distância em outro tecido, com inibição da resposta alérgica pulmonar em ratos, reforçando a ideia deste tipo de terapia. (10) No entanto, as doses utilizadas em ambos os estudos são consideradas extremamente elevadas do ponto de vista translacional, se pensarmos na equivalência de dose para humanos. (15)

Nesse contexto, o objetivo deste artigo é avaliar especificamente a eficácia do lisado bacteriano OM-85 na prevenção de inflamação de vias aéreas em um modelo murino de inflamação eosinofílica de vias aéreas inferiores, realizando uma primeira fase com protocolos de dose-resposta, compatível com doses humano-equivalentes, com posterior teste de eficácia mais detalhado utilizando somente uma dose.

## Métodos

### Fase I

Animais

Foram utilizados 32 camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, em idade neonatal (entre 3 e 4 semanas de vida), provenientes do biotério da instituição (CeMBE, PUCRS). Os animais foram alimentados, antes e durante a fase de experimentação, com ração balanceada para roedores e água *ad libitum*. Criados em biotério convencional, os animais foram mantidos em gaiolas, devidamente identificadas, sob fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (6:00/18:00). Os animais foram agrupados de acordo com a dose do lisado bacteriano (OM-85) recebida (0,5 μg, 5 μg e 50 μg), em 3 grupos de 8 animais cada. Um grupo controle positivo (n=8) recebeu somente solução salina tamponada (DPBS) como placebo, no mesmo volume que os animais tratados com OM-85.

Protocolo de asma e curva dose-resposta ao OM-85

A dose utilizada para sensibilização com ovalbumina (OVA) foi de 20 μg, por via subcutânea (SC), diluída em 200 μL de DPBS para todos os grupos. O desafio intranasal (IN) foi realizado com uma dose de 100 μg de OVA, diluída em 50 μL de DPBS. Para permitir a aspiração pulmonar, os animais foram anestesiados em uma câmara anestésica, utilizando-se isofluorano por cerca de 30 segundos.

Os animais receberam doses de 0,5 μg, 5 μg e 50 μg de OM-85 (Paxoral®, Farmasa, Brasil), por gavagem, durante 5 dias (-10 a -6 dia do protocolo), 10 dias antes do início da sensibilização com OVA, que ocorreu nos dias 0 e 7 do protocolo. O desafio intranasal com OVA foi realizado por 3 dias consecutivos, após a sensibilização (dias 14, 15 e 16 do protocolo). Os grupos e protocolos são apresentados na Tabela 1 e Figura 1, respectivamente. Mensuração de função pulmonar e realização de lavado broncoalveolar LBA foram realizados no final do protocolo.

**Tabela 1**. Grupos do estudo de acordo com a fase e dose de OM-85 recebida.

| **Grupos** | Número de animais |
|---|---|
| **Fase I** | n=32 |
| **OM-85 (0,5 μg)** | 8 |
| **OM-85 (5 μg)** | 8 |
| **OM-85 (50 μg)** | 8 |
| **Controle positivo** | 8 |
| | |
| **Fase II** | n=20 |
| **OM-85 (5 μg)** | 8 |
| **Controle positivo** | 8 |
| **Controle negativo** | 4 |

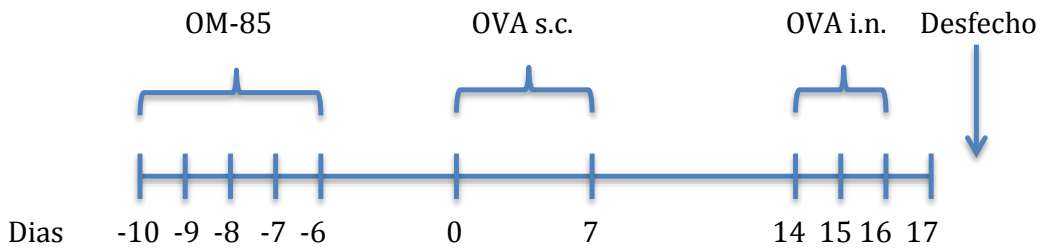


**Figura 1. Protocolo utilizado para indução de resposta pulmonar alérgica aguda em camundongos BALB/c e uso precoce de OM-85.** OVA: ovalbumina; s.c.: subcutânea; i.n.: intranasal. O grupo controle positivo recebeu somente solução salina tamponada (DPBS) como placebo ao invés de OM-85 por gavagem e o controle negativo recebeu DPBS em todos os procedimentos (gavagem, injeção subcutânea e desafio intranasal), nos mesmos volumes que os animais tratados. OVA: ovalbumina; s.c.: sub-cutânea; i.n.: intranasal.

**Fase II**

A partir dos resultados dos protocolos de dose-resposta, uma dose foi escolhida para verificarmos em maior detalhe o efeito do OM-85 sobre a resposta pulmonar alérgica. O experimento foi então repetido (n=16), com grupos controle positivo (n=8) e negativo (n=4). A sensibilização e desafio intranasal (IN) com OVA foram realizados do mesmo modo que a fase I. Os grupos e protocolos da Fase II são apresentados também na Tabela 1 e na Figura 1, respectivamente.

Função pulmonar

A função pulmonar foi realizada na Fase II, após canulação da traquéia por traqueostomia, com o animal anestesiado. O mesmo foi mantido em um ventilador (Harvard Minivent, Hugo Sachs Elektronik, USA), por 5 minutos, antes do início do teste. Foram realizadas seis medidas de técnica de oscilação forçada, durante pausa do respirador (6 segundos). Os dados coletados no teste de função pulmonar foram analisados em software específico (WinLung, Hungria), com mensuração de resistência das vias aéreas e propriedades elásticas (viscosidade e elasticidade) do pulmão (Raw, G, H e G/H), através da impedância pulmonar (16).

Lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi realizado em ambas as fases do estudo, através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina 2% e cetamina 5%, com proporção de 1:9 na solução (dose: 0,1 ml). Uma solução de DPBS (1 mL) foi instilada via intratraqueal, e aspirada logo após, por 3 vezes consecutivas. Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais dos fármacos utilizados para anestesia, em uma dose 3 vezes maior, e descartados de acordo com as normas da instituição.

Contagem total de células e exame citológico diferencial no LBA

A amostra do LBA foi centrifugada a 2000 rpm, por 4 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 300 μL de DPBS. Foi realizada a contagem total de células (CTC) e o cálculo de viabilidade celular em 10 μL desta suspensão, em todas as amostras, através do método de exclusão de azul de tripan, em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Para a análise da citologia diferencial, 80 μL da suspensão do precipitado foram colocados em citocentrífuga (30g, por 5 minutos) e deixados secar a temperatura ambiente. As células foram coradas com kit panótico rápido (Laborclin, Brasil) e analisadas de acordo com sua morfologia. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico foram expressos em percentagem, após a contagem de 400 células.

Análise histopatológica

Após remoção dos pulmões, na Fase II, foi realizada perfusão com formalina tamponada a 10%, através de coluna de gravidade (20 mmHg). As lâminas foram preparadas a partir de cortes de 4 μm de blocos de parafina de tecido pulmonar e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica em microscópio óptico. Uma avaliação qualitativa da presença de resposta inflamatória brônquica foi realizada, bem como contagem do número de eosinófilos em um campo, em 3 brônquios diferentes, para classificação de gravidade da inflamação eosinofílica.

IgE específica para OVA

Foi analisada a sensibilização à ovalbumina através da mensuração de IgE específica para OVA no LBA pelo método de ELISA (MD Biosciences, Inc.), segundo instruções do fabricante.

Citometria de fluxo

Os sobrenadantes de LBA foram congelados a -80□C, para posterior análise. Os níveis de IL-4 e IFN-γ foram então mensurados em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD, USA) com a utilização do *kit Cytometric Bead Array* (CBA) Flex SetTM, conforme metodologia descrita pelo fabricante (BD Biosciences, USA).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS, versão 17.0. Para comparação entre cada grupo e o controle positivo, foi realizado teste t de student. O nível de significância estabelecido foi de 0,05. Como desfecho principal, utilizamos a contagem diferencial de células, com presença de eosinófilos no LBA dos animais, por ser a célula efetora do sistema imune mais importante neste modelo experimental. Além da medida da IgE sanguínea, dosagem das citocinas inflamatórias (IL-4 e IFN-γ) e função pulmonar nos camundongos.

O cálculo do tamanho amostral foi de 8 animais por grupo. Este cálculo foi baseado em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA para uma média de 0,7 x $10^6$ cél/ml, com desvio padrão de ±0,34, um valor de p=0,05, e poder de 80%, com diferença entre as médias dos grupos estimada em 80%.

Aspectos éticos

O estudo foi realizado sob normas éticas para pesquisa em modelos animais, seguindo o preconizado pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), preconizando a utilização do menor número de animais e manejo da dor e sofrimento durante

os procedimentos do estudo e eutanásia. Este estudo teve a aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da instituição.

**Resultados**

Utilizamos o lisado bacteriano OM-85 no início da vida para avaliar a capacidade de um extrato bacteriano de inibir a resposta eosinofílica pulmonar em camundongos BALB/c. Inicialmente, realizamos uma primeira fase para tentar encontrar uma dose mais eficaz do OM-85. A média do retorno do LBA de todos os animais foi de 0,69±0,12 ml, com viabilidade celular média de 100%. A média de eosinófilos do LBA no grupo controle negativo foi de 3,4±2,3 %, e no controle positivo foi de 71,39±6,8 %. Valores do volume de retorno, viabilidade celular, e número de eosinófilos nos controles positivos e negativos compreendem os valores esperados para este modelo.

A contagem total de células no LBA foi semelhante nos grupos controle positivo, 0,5 μg, 5 μg e 50 μg (p=0,96), ocorrendo o mesmo com o número de linfócitos (p=0,42), macrófagos (p=0,70), neutrófilos (p=0,91) e eosinófilos (p =0,88). A resposta inflamatória celular no LBA da Fase I do estudo é apresentada na Figura 2.

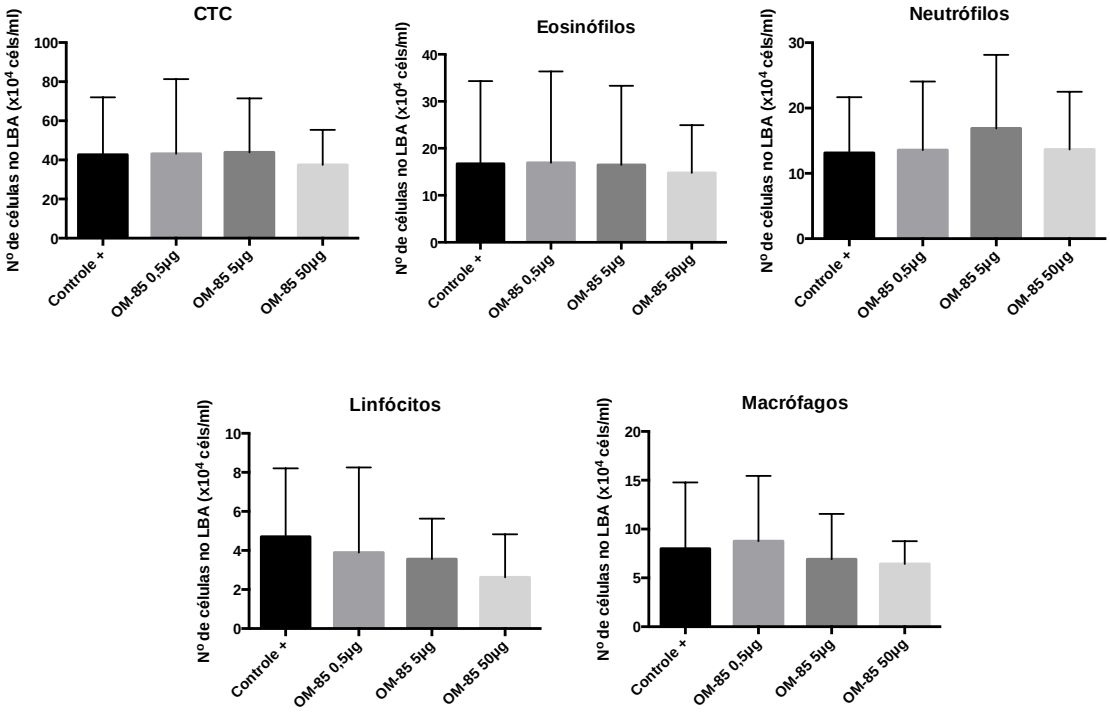


**Figura 2. Comparação da contagem total e diferencial no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados na Fase I**. Os grupos estudados foram: controle positivo (Controle +), OM-85 0,5 μg, OM-85 5 μg e OM-85 50 μg. O grupo controle negativo não foi incluído nestas análises.

Ao verificarmos na Fase I que o OM-85 não reduziu a resposta pulmonar eosinofílica quando comparado ao controle positivo, independente da dose utilizada, decidimos escolher a dose intermediária para a Fase II (5 μg/animal), repetindo o experimento para comparação com o controle positivo e negativo, com o objetivo de comprovar que o OM-85 não inibe a resposta inflamatória eosinofílica pulmonar ou sistêmica dos camundongos, ampliando os desfechos de análise. Não houve diferença na resposta pulmonar eosinofílica ente o grupo controle positivo e o OM-85 5 μg. Nesta fase, os neutrófilos do grupo OM-85 μg mostraram-se aumentados e os linfócitos reduzidos no LBA em relação ao controle positivo. Os resultados da celularidade do LBA na Fase II são apresentados na Figura 3.

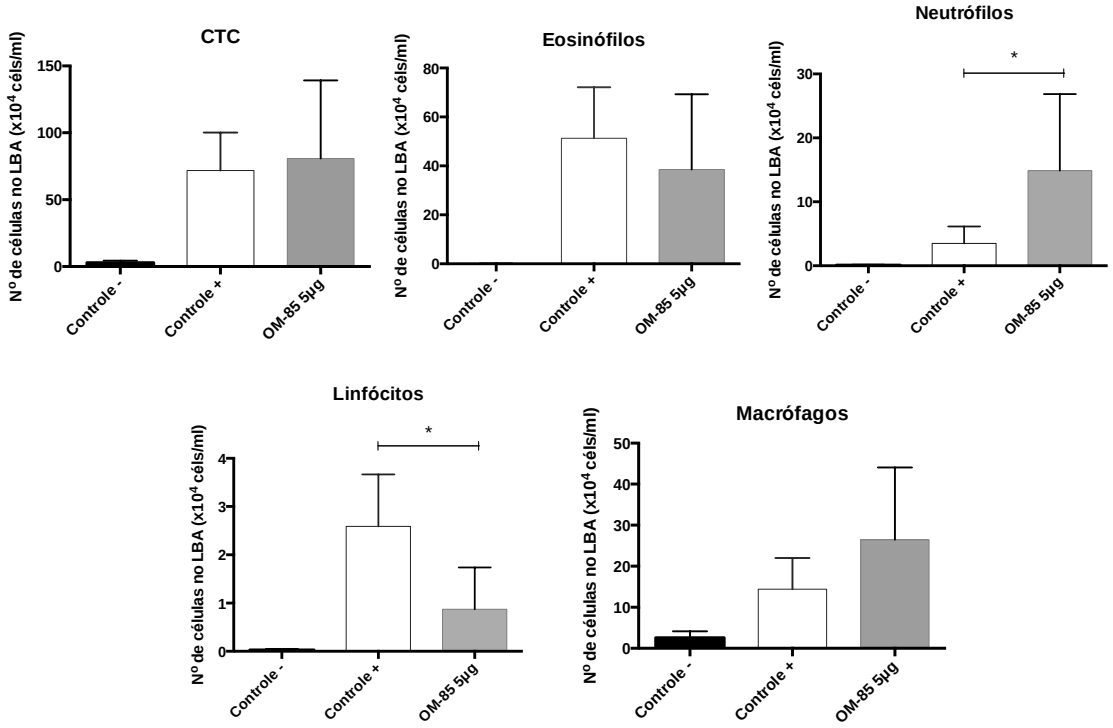


**Figura 3. Comparação da contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados na Fase II**. Os grupos estudados nessa fase foram: controle positivo (Controle +), controle negativo (Controle -) e OM-85 5 µg. O Controle negativo foi utilizado para ilustração da resposta celular inflamatória do modelo murinho, mas não foi utilizado nos testes estatísticos. *p<0,01.

O grupo com 5 µg e o controle positivo apresentaram IgE específica para OVA (p< 0,0001) e IL-4 (p<0,001) mais elevados em relação ao controle negativo, mas semelhantes entre eles (controle positivo *versus* OM-85) (Figura 4). Os níveis de INF-gama no LBA foram todos inferiores aos níveis de detecção.

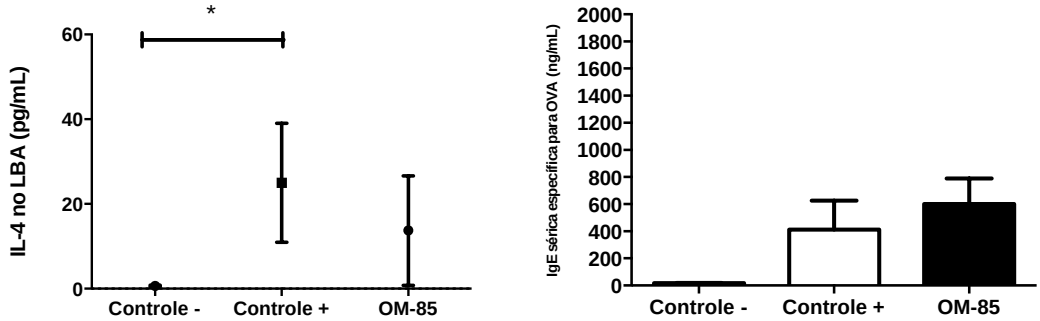


**Figura 4. Níveis de IL-4 no lavado broncoalveolar (LBA) e de IgE específica séricos para ovalbumina (OVA) entre os grupos estudados.** *p=0,04

A resistência das vias aéreas medida por impedância com o método de oscilação forçada não mostrou diferença entre o grupo OM-85 com 5 μg e o controle positivo (Figura 5).

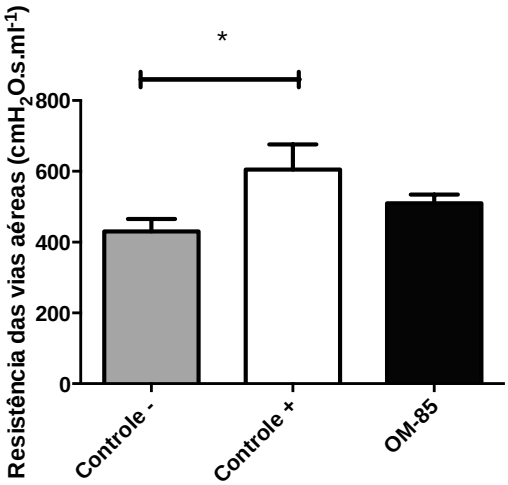


**Figura 5. Resistência das vias aéreas medida por impedância com o método de oscilação forçada**. *p<0,037

Por fim, a análise histológica entre os grupos demonstrou que o infiltrado celular peribroncovascular intenso, com predomínio de linfócitos e eosinófilos, foi semelhante entre os grupos em que foi utilizado 5 μg de OM-85 e o controle positivo. O grupo controle negativo apresentou anatomia preservada, sem alterações inflamatórias, característico de animais saudáveis (Figura 6).

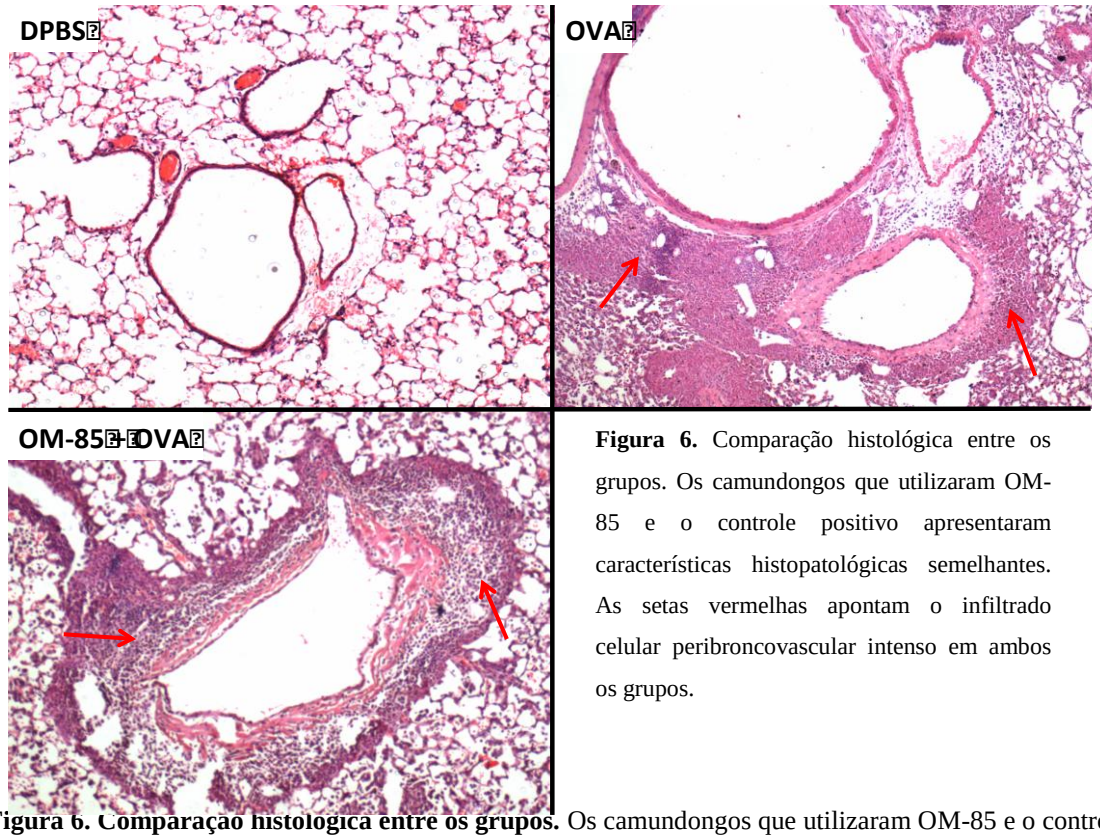


**Figura 6.** Comparação histológica entre os grupos. Os camundongos que utilizaram OM-85 e o controle positivo apresentaram características histopatológicas semelhantes. As setas vermelhas apontam o infiltrado celular peribroncovascular intenso em ambos os grupos.

**Figura 6. Comparação histológica entre os grupos.** Os camundongos que utilizaram OM-85 e o controle positivo apresentaram caraterísticas histopatológicas semelhantes. As setas vermelhas apontam o infiltrado celular peribroncovascular intenso em ambos os grupos.

## Discussão

Verificamos que o extrato de lisado bacteriano OM-85 administrado no início da vida, em doses humano-equivalentes, não inibiu o desenvolvimento da resposta pulmonar alérgica em camundongos, em relação à contagem total de células, inflamação pulmonar, eosinofilia pulmonar e sanguínea e produção de IgE específica para ovalbumina. Tivemos o cuidado de testar três doses mais próximas da equivalência para uso em humanos, ampliando desfechos de análise utilizando a dose intermediária testada (Fase II). Na fase II, não encontramos diferença de efeito do OM-85 na resposta pulmonar eosinofílica, de citocinas Th2 e Th1 no LBA, nas alterações histopatológicas e na resistência das vias aéreas.

Os primeiros estudos com OM-85 datam da década de 90, onde foi relatado seu efeito imunomodulatório na ativação de macrófagos, células *natural killer* e produção de citocinas no combate à infecções (17-21). Desde então, seu efeito sobre a redução de infecções do trato

respiratório vem sendo estudado com resultados positivos em crianças e adultos (20, 22-25). Sua eficácia em asma, no entanto, precisava ser melhor explorada.

Então, especificamente em asma, dois estudos mais recentes avaliaram o efeito do OM-85 sobre a resposta alérgica pulmonar em roedores, analisando o aspecto mecanístico da estimulação de linfócitos $T_{reg}$ pelo OM-85 administrado pelo trato gastrointestinal. (10, 14). Strickland et al. mostraram inibição da hiperresponsividade brônquica, inflamação pulmonar, produção de IgE específica e de citocinas Th2 em um modelo de asma em ratos com OVA. Mostraram também que após a inalação do aeroalérgeno, e antes de sua translocação às vias aéreas regionais através da drenagem dos linfonodos, ocorre a ativação de células dendríticas quiescentes da mucosa da via aérea (CDMVA) através da interação com células T de memória, levando ao aumento da expressão de CD86 e aumento da atividade estimulatória da célula T através destas células dendríticas *in situ*. Interações subsequentes entre CDMVA e células T de memória transitória resultam em ativação da resposta da célula $T_H$ local, com duração determinada pela atividade da célula regulatória ($T_{reg}$). A importância da resposta $T_{reg}$ no controle da hiperresponssividade brônquica e associação com doenças alérgicas podem representar um novo tratamento para asma (10). Navarro et al., na mesma linha de investigação, mostrou que o OM-85 inibe também a resposta pulmonar alérgica em camundongos, estimulando a produção de células $T_{reg}$ no pulmão. (14) No entanto, nosso estudo mostrou resultados diametralmente opostos, não encontrando inibição da resposta pulmonar alérgica pelo OM-85 em modelo murino de asma, utilizando 3 doses do lisado bacteriano. A explicação mais provável para o nosso achado é que utilizamos doses muito mais baixas do OM-85, que foram baseadas em cálculo de dose humano-equivalentes. Se considerarmos a conversão da dose utilizada nos animais dos estudos de Strickland et al. e Navarro et al., as doses humano-equivalentes de OM-85 para crianças (considerando um peso de uma criança de 10 kg) seriam de aproximadamente 96 mg/kg e 150 mg/kg, respectivamente. Essas doses seriam extremamente elevadas para uso em crianças, tornando a sugestão translacional dos autores inviável. As doses de 0,5 μg, 5 μg e 50 μg que utilizamos de OM-85 em camundongos nos permitiriam realizar estudos clínicos em crianças, por resultarem em doses humano-equivalentes de 0,002 mg/kg, 0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg, respectivamente. No entanto, nossas doses não mostraram efeito inibidor da resposta pulmonar alérgica. Além disso, testamos previamente a dose de 700 μg (dose humano equivalente de 2,85 mg/kg) de OM-85 no mesmo modelo, sem resultados positivos (resultados não publicados).

Na Fase II do nosso estudo, encontramos alterações na contagem de neutrófilos e eosinófilos no LBA. Não conseguimos encontrar uma explicação para estes achados, e acreditamos que eles não modificam as conclusões do nosso estudo em relação a ausência de efeito do OM-85 na inibição da resposta pulmonar alérgica em camundongos.

Quanto aos níveis de citocinas no LBA encontrados neste estudo, mostramos que IL-4 estava elevada nos dois grupos de modelos de camundongos (controle positivo e OM-85), sem aumento de IFN-γ. Esta última citocina mostrou-se elevada sistemicamente em modelo murino de OVA tratado com OM-85 (26), mas Navarro et al. encontraram os mesmos resultados do nosso estudo, sugerindo que o OM-85 não estimula a resposta Th1 no pulmão. Nossos achados negativos são reforçados ainda pelo resultado de ausência de redução pelo OM-85 de IgE específica para OVA no LBA, quando comprado ao controle positivo.

Uma das limitações do nosso estudo foi não avaliar o feito do OM-85 em relação ao estímulo de células $T_{reg}$ no pulmão. Porém, ao mostrarmos que o OM-85 não teve eficácia nos nosso estudo pré-clínico em camundongos, utilizando os desfechos mais importantes desse modelo (celularidade no LBA e achados histológicos), esta análise nos parece mais secundária do ponto de vista de aplicação dos nossos resultados.

Concluindo, nosso estudo demonstrou que o uso precoce de OM-85, em doses humano-equivalentes, não exerce um papel de inibição do desenvolvimento da asma em modelo murino. Nossos resultados não estimulam a exploração de estudos utilizando o OM-85 em crianças com fatores de risco para desenvolvimento de asma de origem alérgica no início da vida.

**Referências**


1. Global strategy for asthma managment and prevention [database on the Internet]2009 [cited March 2014]. Available from: http://www.ginasthma.org.

2. Forsythe P. Probiotics and lung immune responses. Ann Am Thorac Soc. 2014 Jan;11 Suppl 1:S33-7.

3. Azad MB, Coneys JG, Kozyrskyj AL, Field CJ, Ramsey CD, Becker AB, et al. Probiotic supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2013;347:f6471.

4. Elazab N, Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Quizon A, Forno E. Probiotic administration in early life, atopy, and asthma: a meta-analysis of clinical trials. Pediatrics. 2013 Sep;132(3):e666-76.

5. Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma? J Allergy Clin Immunol. 2010 Jun;125(6):1202-5.

6. Jackson DJ. Early-life viral infections and the development of asthma: a target for asthma prevention? Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2014 Apr;14(2):131-6.

7. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. N Engl J Med. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Sep 19;347(12):869-77.

8. Huber M, Mossmann H, Bessler WG. Th1-orientated immunological properties of the bacterial extract OM-85-BV. Eur J Med Res. 2005 May 20;10(5):209-17.

9. Razi CH, Harmanci K, Abaci A, Ozdemir O, Hizli S, Renda R, et al. The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children. J Allergy Clin Immunol. 2010 Oct;126(4):763-9.

10. Strickland DH, Judd S, Thomas JA, Larcombe AN, Sly PD, Holt PG. Boosting airway T-regulatory cells by gastrointestinal stimulation as a strategy for asthma control. Mucosal Immunol. 2011 Jan;4(1):43-52.

11. Del-Rio-Navarro BE, Espinosa Rosales F, Flenady V, Sienra-Monge JJ. Immunostimulants for preventing respiratory tract infection in children. Cochrane Database Syst Rev. 2006(4):CD004974.

12. Weinberger M. Can we prevent exacerbations of asthma caused by common cold viruses? J Allergy Clin Immunol. 2010 Oct;126(4):770-1.

13. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. J Clin Immunol. 1987 Jul;7(4):265-76.

14. Navarro S, Cossalter G, Chiavaroli C, Kanda A, Fleury S, Lazzari A, et al. The oral administration of bacterial extracts prevents asthma via the recruitment of regulatory T cells to the airways. Mucosal Immunol. 2011 Jan;4(1):53-65.

15. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. Faseb J. 2008 Mar;22(3):659-61.

16. Hantos Z, Petak F, Adamicza A, Asztalos T, Tolnai J, Fredberg JJ. Mechanical impedance of the lung periphery. J Appl Physiol (1985). 1997 Nov;83(5):1595-601.

17. Broug-Holub E, Kraal G. In vivo study on the immunomodulating effects of OM-85 BV on survival, inflammatory cell recruitment and bacterial clearance in Klebsiella pneumonia. Int J Immunopharmacol. 1997 Sep-Oct;19(9-10):559-64.

18. Mauel J. Macrophage activation by OM-85 BV. Respiration. 1992;59 Suppl 3:14-8.

19. Mauel J. Stimulation of immunoprotective mechanisms by OM-85 BV. A review of results from in vivo and in vitro studies. Respiration. 1994;61 Suppl 1:8-15.

20. Paupe J. Immunotherapy with an oral bacterial extract (OM-85 BV) for upper respiratory infections. Respiration. 1991;58(3-4):150-4.

21. Wybran J, Libin M, Schandene L. Activation of natural killer cells and cytokine production in humans by bacterial extracts (OM-85 BV). Lung. 1990;168 Suppl:720-5.

22. Bitar MA, Saade R. The role of OM-85 BV (Broncho-Vaxom) in preventing recurrent acute tonsillitis in children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2013 May;77(5):670-3.

23. Derenne JP, Delclaux B. Clinical experience with OM-85 BV in upper and lower respiratory tract infections. Respiration. 1992;59 Suppl 3:28-31.

24. Schaad UB. OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review. World J Pediatr. 2010 Feb;6(1):5-12.

25. Schaad UB, Mutterlein R, Goffin H. Immunostimulation with OM-85 in children with recurrent infections of the upper respiratory tract: a double-blind, placebo-controlled multicenter study. Chest. 2002 Dec;122(6):2042-9.

26. Huber M, Mossmann H, Bessler WG. Th1-orientated immunological properties of the bacterial extract OM-85-BV. Eur J Med Res. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 May 20;10(5):209-17.

# CAPÍTULO III

## 3.1 ARTIGO ORIGINAL 2

**Título:** Características clínicas e fenotípicas de asma grave resistente à terapia em crianças brasileiras.

**Title:** Clinical and phenotypical characteristics of severe therapy-resistant asthma in Brazilian children.

**Autores:** Andrea Rodrigues, Giovana Santos, João Paulo Heinzmann Filho, Rodrigo Godinho de Souza, Mauro Vargas, Cristian Roncada, Leonardo Pinto, Marcus Herbert Jones, Renato Stein, Paulo Márcio Pitrez.

## RESUMO

**Introdução:** estudos de crianças com asma grave resistente à terapia (AGRT) são escassos em países desenvolvidos e não há dados publicados sobre apresentação clínica e características desses pacientes em países em desenvolvimento.

**Objetivo:** descrever as principais características clínicas, funcionais, radiológicas e de inflamação no escarro induzido de crianças com AGRT, provenientes de um centro de referência do sul do Brasil.

**Métodos:** foram selecionadas retrospectivamente crianças entre 6-14 anos, acompanhadas por pelo menos 6 meses em um centro de referência do sul do Brasil, com diagnóstico AGRT (asma não controlada, usando doses elevadas de corticoide inalatório associado a beta-2 agonista de ação longa). A partir de dados coletados prospectivamente no seguimento clínico, foram analisados controle da doença, função pulmonar, teste cutâneo para aeroalérgenos, avaliação da inflamação no escarro induzido, tomografia de tórax, e phmetria.

**Resultados:** 21 pacientes foram selecionados (média de 9,2 anos). Dezoito (86%) pacientes são atópicos. A maioria dos pacientes apresenta pouco controle da doença, com função pulmonar basal sempre próxima do normal. Dois pacientes apresentaram escarro paucigranulocítico, 4 eosinofílico e 7 neutrofílico, onde 67% que repetiram o exame apresentaram mudança no padrão inflamatório. 6/7 (86%) pacientes que utilizaram omalizumabe (anti-IgE) apresentaram melhora importante da qualidade de vida, com redução importante das exacerbações.

**Conclusões:** crianças com AGRT apresentam doença difícil de controlar, função pulmonar próxima do normal e padrão inflamatório das vias aéreas variável durante seguimento clínico. Esse perfil, diferente dos adultos, precisa ser melhor entendido em relação aos mecanismos que resultam em sintomas não responsivos a terapias medicamentosas otimizadas.


**Descritores:** asma grave, atopia, escarro, função pulmonar

**ABSTRACT**

**Introduction:** Studies of children with severe therapy-resistant asthma are scarce in developed countries and there is no published data about clinical presentations and characteristics of these patients in developing countries.

**Objective:** To describe the main clinical characteristics, lung function, radiological findings, and inflammation of induced sputum of children with severe therapy-resistant asthma from a reference center in southern Brazil.

**Methods:** Children between 6-14 years of age, followed by at least 6 months in a reference center, with severe therapy-resistant asthma (uncontrolled asthma using elevated doses of inhaled corticoid associated with long-acting beta-2 agonist) were retrospectively selected. Most of the subjects from the reference center had clinical data, disease control, lung function, skin test reactivity to aeroallergens, inflammation of induced sputum, chest computerized tomography, and pH esophageal monitoring results prospectively collected.

**Results:** 21 patients were selected (mean age: 9.2 yo). Eighteen patients (86%) were atopic. Most patients presented uncontrolled disease during most visits, with nearly normal baseline lung function parameters. The sputum of two patients were paucigranulocytic, 4 were eosinophilic and 7 neutrophilic, where 67% of the children who repeated sputum exam changed the inflammatory patterns. 6/7 (86%) of the children who were treated with omalizumab (anti-IgE) showed improvement in quality of life, with an important reduction in exacerbations and hospitalizations.

**Conclusions:** Most children with severe therapy-resistant asthma from a non-affluent population were patients with difficult-to-control disease, with nearly normal lung function and prone to change airway inflammatory pattern during follow-up. This profile, unlike adults, need to be better understood in relation to the mechanisms that result in symptoms unresponsive to optimized drug therapies.

**Key words:** severe asthma, atopy, sputum, lung function

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores que acomete cerca de 300 milhões de pessoas em todo mundo, afetando crianças em 60% dos casos, e resultando em elevados custos para a sociedade, com mais de 250.000 óbitos por ano no mundo.[1] Alguns países em desenvolvimento apresentam prevalências elevadas de asma na infância, particularmente na América Latina.[2] Atualmente, um dos fatores mais impactantes da asma é o importante comprometimento da qualidade vida do paciente. Este fato ocorre especificamente em indivíduos com doença não controlada, e está mais associado aos casos de maior gravidade, com elevados custos para a sociedade.[3,4]

A asma de difícil controle na criança representa o maior desafio clínico, com prevalência estimada em 0,5% da população escolar (aproximadamente 5% das crianças com asma)[5], apesar da otimização do tratamento implantado. O diagnóstico errôneo ou má adesão ao tratamento podem mimetizar este quadro. Crianças com asma de difícil controle apresentam exacerbações frequentes com sintomas diários, piorando, assim, sua qualidade de vida, com grande impacto em atendimento médico, perda escolar, hospitalizações e custos financeiros para a família e sociedade. Em crianças, é um termo amplo para definir aquele paciente com asma que, mesmo com doses altas de corticoide inalatório associados a outros medicamentos controladores, não obtém controle da doença. É caracterizada por sintomas contínuos, exacerbações e necessidade frequente de uso de beta-2 agonistas de curta ação a despeito de uma dose diária de pelo menos 800μg de budesonida, por no mínimo 6 meses.[6]

O impacto da morbidade da asma grave é importante, pois esses pacientes sofrem com perdas escolares, inúmeras consultas, hospitalizações e comprometimento emocional. Dentro deste grupo de pacientes, a apresentação clínica mais delicada é a do paciente com asma grave resistente a terapia farmacológica (AGRT), que necessita de uma abordagem sistemática. Assim, crianças com AGRT, para realização deste diagnóstico, necessitam de uma avaliação sistemática para exclusão de outras doenças (fibrose cística, imunodeficiências, entre outras), e manejo de má técnica inalatória, má adesão ao tratamento, co-morbidades relevantes e fatores ambientais importantes[7] A partir desta avaliação sistemática é que se inicia o maior desafio clínico, que é o de tentar melhor controlar a doença com terapias mais específicas e algumas com maiores eventos adversos, como o omalizumabe (anti-IgE) ou corticoide oral contínuo.[8,9] Infelizmente, a AGRT em crianças é ainda muito pouco entendida, e parece ser diferente da forma de apresentação em adultos.[10] Existem poucos trabalhos descrevendo

especificamente as características clínicas de crianças com AGRT[11,12] e analisando em maior detalhe os mecanismos responsáveis por esta apresentação tão grave da doença.[13-15] Além disso, não existem estudos descrevendo a asma grave resistente à terapia em crianças de países em desenvolvimento, apesar de se saber que países de tamanho continental como o Brasil apresentam elevada prevalência de asma grave.[16,17]

Neste contexto, o objetivo do presente estudo é descrever retrospectivamente as principais características clínicas, funcionais, radiológicas e de inflamação das vias aéreas de crianças e adolescentes com AGRT, acompanhados em um centro de referência do sul do Brasil.

## MÉTODOS

*Seleção dos pacientes*

Foram selecionados retrospectivamente crianças e adolescentes, entre 6 e 14 anos de idade, acompanhados em um centro de referência de hospital terciário do sul do Brasil, com diagnóstico de ACRT.[7] Os pacientes deveriam estar em acompanhamento no centro de referência por mais de 6 meses, em visitas mensais, sendo submetidos a uma avalição sistemática para o diagnóstico de AGRT. Os critérios de inclusão foram: 1) crianças com idade entre 6-18 anos com diagnóstico de asma; 2) em uso de, no mínimo, 800 μg de budesonida ou equivalente, associado a beta-2 agonista de ação longa; 3) com manejo adequado das co-morbidades tratáveis (particularmente, rinosinusopatia crônica e refluxo gastro-esofágico) pela equipe médica; 4) técnica de inaloterapia adequada, checada em cada consulta neste período inicial de 6 meses; 5) relato de boa adesão ao tratamento pela equipe assistencial; e, finalmente, 6) mantendo pelo menos um dos seguintes critérios de ausência de controle da doença: a) sintomas crônicos (tosse, sibilos ou dispneia); b) 3 ou mais exacerbações nos últimos 12 meses; c) necessidade frequente de beta-2 agonista de curta duração; d) função pulmonar reduzida e não reversível a tratamento; ou e) necessidade de uso de corticoide contínuo. Foram excluídas crianças com: diagnóstico de outras doenças (fibrose cística, bronquiolite obliterante pós-infecciosa, imunodeficiências, cardiopatias congênitas, entre outras), ou alteração cognitiva importante que interfira nos resultados das provas de função pulmonar e escarro induzido.

No início da avaliação clínica, todos os pacientes realizaram teste do suor e coleta de sangue para solicitação de hemograma, plaquetas, imunoglobulinas, anti-HIV e IgE total.

*Análise da função pulmonar*

Espirometria com medidas de fluxos pulmonares foram realizadas em todas as consultas, exceto quando os pacientes apresentavam exacerbações com sintomas de infecção respiratória viral. Para critério de escolha e comparação, foram escolhidas a primeira espirometria feita no centro de referência e outra repetida 6 meses após otimização do tratamento, com o paciente sem sintomas de infeções virais. Os procedimentos técnicos e os critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade para a realização dos exames de função pulmonar seguem as recomendações da *American Thoracic Society* e *European Respiratory Society* (ATS/ERS).[19] O espirômetro utilizado foi o do modelo Koko (Ferraris, USA). Um mínimo de três curvas aceitáveis da capacidade vital forçada (CVF) foram realizadas com o objetivo de assegurar que o esforço máximo e a cooperação da criança fossem obtidos. Foram então apresentadas as variáveis de CVF, volume expiratório forçado no primeiro segundo ($VEF_1$), $VEF_1$/CVF e fluxo expiratório forçado entre 25-75% da curva ($FEF_{25-75\%}$), sob forma de escore Z. Como valor de referência foram utilizadas as equações do *Global Lungs Initiative* (GLI).[20]

*Avaliação de hipersensibilidade imediata a alérgenos (teste cutâneo)*

Todos os pacientes foram submetidos a realização de teste cutâneo para aeroalérgenos, com extratos alergênicos produzidos pela *International Pharmaceutical Immunology* (IPI-ASAC, Madri, Espanha), no início da avaliação clínica. O teste cutâneo foi realizado na superfície volar medial do antebraço das crianças, com aplicação de uma gota, a uma distância de aproximadamente 2 cm, em sequência predeteminada (histamina, diluente do extrato, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis*, cão, gato, fungos e gramíneas). O extrato de *Aspergillus fumigatus* era incluído naqueles casos com IgE total maior do que 2.000 UI/mL. Após, era realizada uma picada com um dispositivo (PUNTOR®, dispositivo que limita o grau de penetração na pele) para cada alérgeno. Após 3 minutos, era retirado o excesso de extrato. A leitura foi feita entre 15-20 minutos após a aplicação dos extratos. Na ausência de pápula o teste com o diluente do extrato era considerado negativo, a presença de pápulas com diâmetro maior ou igual a 3 mm indicava um teste positivo. O paciente era considerado atópico se apresentasse pelo menos um alérgeno com resposta positiva. O

controle negativo era realizado com soro fisiológico, não havendo formação de pápula no local.

*Avaliação da inflamação das vias aéreas*

A indução do escarro foi realizada por fisioterapeuta capacitado e o processamento por técnico especializado. Todas as crianças com asma realizaram escarro induzido no início do acompanhamento, com repetição do procedimento após 3-6 meses, conforme avaliação clínica individualizada. O procedimento era iniciado após uma espirometria pré e pós-broncodilatadora. Eram realizadas quatro nebulizações com solução salina hipertônica (4,5%), com duração de 5 minutos, conforme protocolo descrito anteriormente.[21] A inalação da solução hipertônica era seguida pela mensuração do $VEF_1$, até completar 20 minutos ou até que a queda do $VEF_1$ fosse igual ou superior a 20%. A criança era instruída a tossir e depositar o escarro em um recipiente estéril, ao final de cada nebulização. O escarro era processado imediatamente após coleta.

Os grumos de escarro eram então separados e diluídos em uma solução de DPBS e DTT, e filtrados em filtro de 60 µm. Após centrifugação a 2.000 rpm, por 2 minutos, o sobrenadante era removido, e o precipitado ressuspendido em 1 mL de DPBS. Dessa solução, era realizada a contagem total de células em câmara de Neubauer. A viabilidade celular era determinada através do método de exclusão pelo azul de tripan. O exame citológico diferencial era realizado após citocentrifugação (500 rpm, em 5 minutos) em lâminas coradas com May-Grumwald-Giemsa. Eram contadas 400 células e os resultados foram expressos como percentual das células. Amostras com contagem de células epiteliais escamosas > 20% foram consideradas provenientes de vias aéreas superiores. Os escarros com menos de 20% de células epiteliais escamosas foram classificados em: paucigranulocítico (<2% eosinófilos e <54% de neutrófilos), eosinofílico (>2% eosinófilos e <54% de neutrófilos), neutrofílico (<2% eosinófilos e >54% de neutrófilos), ou misto (>2% eosinófilos e >54% de neutrófilos).[22]

*Avaliação por imagem*

Foram analisados os exames de TCAR daqueles pacientes que realizaram o exame durante acompanhamento clínico, por indicação da equipe médica assistencial, por um médico radiologista.

*Avaliação da pHmetria esofágica*

Exame de pHmetria esofágica foi solicitada por decisão da equipe assistencial para aqueles pacientes que tinham sintomas sugestivos de refluxo gastro-esofágico (regurgitação, pirose, ou muitos sintomas respiratórios noturnos). Este procedimento não é realizado de rotina pela equipe assistencial na avaliação de crianças com AGRT. Aqueles pacientes que realizaram pHmetria tiveram seus laudos analisados no estudo por um gastroenterologista pediátrico, sendo classificados como exame com refluxo gastro-esofágico patológico ou não patológico.

*Aplicação de questionários*

Nas consultas médicas era aplicado o questionário de *Asthma Control Test* (ACT), para aquelas crianças maiores de 12 anos. O ACT é um questionário autoaplicável em pacientes maiores de 12 anos, e possui cinco itens que dizem respeito aos sintomas, uso de medicação de alívio e efeito da asma nas atividades diárias, sem a necessidade de medidas de função pulmonar.[23] Foram incluídos os dados de ACT somente daqueles pacientes com mais de 5 avaliações consecutivas em consultas clínicas.

*Aspectos éticos*

Para inclusão dos pacientes foram explicados os objetivos da pesquisa e solicitada assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pela criança e pelos pais ou responsáveis. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

**RESULTADOS**

Foram selecionadas 21 crianças com AGRT, sendo 10 (47,6%) pacientes do sexo masculino e idade média de 9,2 anos. As características demográficas e clínicas dos pacientes são apresentadas na Tabela 1. Dois (9,5%) pacientes estavam utilizando corticoide oral contínuo. Todos os pacientes incluídos apresentavam sintomas quase que diários de asma (incluindo noturnos e aos exercícios) e exacerbações frequentes, metade com história de mais de uma hospitalização pela doença, com grande comprometimento da qualidade de vida do paciente e dos familiares. Os níveis de IgE total séricos variaram bastante, com 12 pacientes apresentando valores maiores de 500UI/ml. O omalizumabe (anti-IgE) foi utilizado em 8 (33,3%) crianças, somente uma tendo sido suspensa mais de 12 meses após por não parecer ter apresentado resposta clínica. Todos os outros pacientes apresentaram melhora importante da qualidade de vida, sem apresentar mais hospitalizações ou exacerbações frequentes. Não houve nenhum relato de evento adverso com o uso do omalizumabe nesses pacientes. Os pacientes com AGRT do estudo que não utilizaram omalizumabe justificaram-se por serem não atópicos ou por apresentarem IgE total fora dos limites indicados em bula. Somente um paciente do estudo utiliza macrolídeo contínuo. Este paciente é menor de 6 anos, não tem indicação de uso de omalizumabe pela faixa etária, e mesmo com características de asma de origem atópica, mostrou melhora importante do controle da doença com teste terapêutico com azitromicina contínua em regime de três vezes por semana.

**Tabela 1-** Características das crianças com asma grave resistente à terapia.

| | n=21 |
|---|---|
| Sexo, masculino | 10/21 (47,6%) |
| Idade, anos | 9,2±2,98 |
| História familiar de asma | 21/21 (100%) |
| Tabagismo domiciliar | 8/21 (38%) |
| Rinite alérgica | 21/21 (100%) |
| Dermatite atópica | 4/21 (19%) |
| Obesidade | 5/21 (23,8%) |
| Início dos sintomas, meses | 1,14±0,95 |
| Sintomas de RGE | 3/21 (14,3%) |
| Corticoide oral contínuo | 5/21 (23,8%) |
| Uso de montelucaste | 6/21 (25,6%) |
| História de hospitalização | 11/21 (52,4%) |
| IgE sérica | |
| **<30** | 0/19 (0%) |
| **30-500** | 7/19 (36,8%) |
| **>500** | 12/19 (63,2%) |
| Resposta ao broncodilatador | 6/21 (25,6%) |
| pHmetria esofágica | 6/10 (60%) |

- RGE: refluxo gastro-esofágico.

Vinte pacientes realizaram teste cutâneo. Em 16 (80%) crianças o teste mostrou-se positivo para pelo menos um alérgeno. Os alérgenos mais frequentes foram para ácaros da poeira doméstica (*D. pteronyssinus, D. farinae e B. tropicalis*). Cão e gato não parecem ser alérgenos comuns nesse grupo de pacientes. O teste para *Aspergillus fumigatus* foi realizado em 5 pacientes que a IgE total sérica foi maior que 2.000, nos quais todos foram negativos. Cinco pacientes eram não atópicos. (Figura 1)

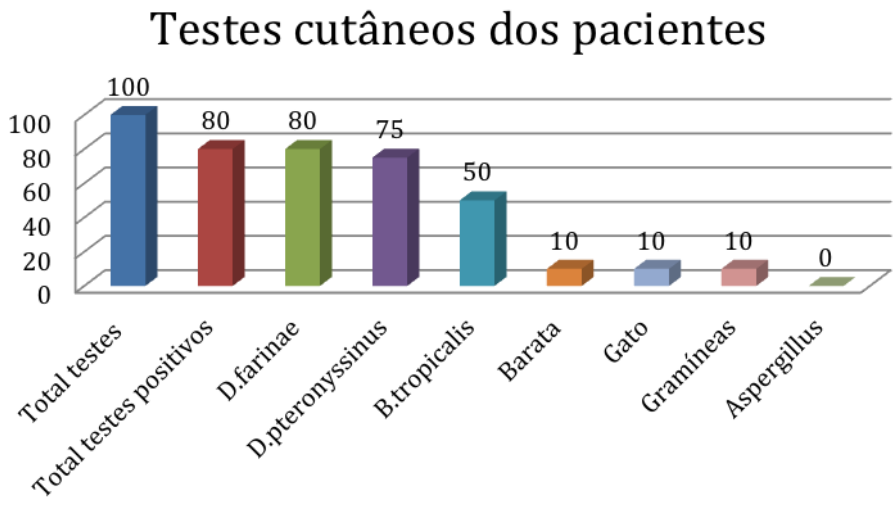


**Figura 1. Percentual de testes cutâneos positivos nas crianças com asma grave resistente à terapia e distribuição da positividade em relação aos tipos de alergenos testados.**

Em relação à função pulmonar, observou-se que todos os pacientes apresentavam curva fluxo-volume dentro dos limites da normalidade ou um distúrbio ventilatório obstrutivo leve, sendo que esta variação foi também encontrada nos mesmos pacientes na segunda avaliação de espirometria, aproximadamente 6 meses depois. Das variáveis de função pulmonar, a CVF mostrou-se menor após otimização do tratamento. Não houve diferença significativa entre as variáveis mais relacionadas à doença obstrutiva brônquica, entre as duas medidas (Figura 2).

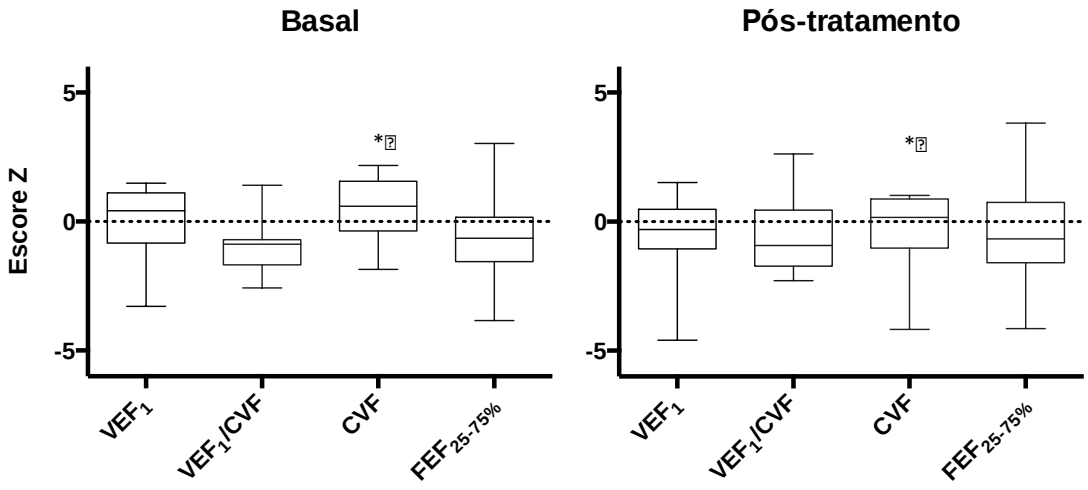


**Figura 2. Comparação da função pulmonar de crianças com asma grave resistente à terapia no início da avaliação clínica e após otimização do tratamento no centro de referência (variáveis expressas em escore Z do valor de referência do Global Lungs Initiative; n=21).** * p=0,015

Foram realizadas 10 pHmetrias esofágicas. Seis exames mostraram refluxo gastro-esofágico (RGE) patológico, mas apenas um paciente pareceu apresentar melhora clínica da asma após início do tratamento para RGE.

O escarro induzido foi realizado em 18 pacientes. Foi obtido com sucesso em 13 crianças no início da avaliação. Nos demais, não foi possível obter escarro ou por quantidade de amostra insuficiente ou por amostra compatível com vias aéreas superiores. Em relação a padrões de inflamação do escarro, encontramos 2 paucigranulocíticos, 4 eosinofílicos e 7 neutrofílicos. (Figura 3) De 6 crianças que repetiram o exame de escarro com sucesso, quatro (67%) apresentaram alteração no padrão de inflamação (eosinofílico para neutrofílico, neutrofílico para paucigranulocítico, paucigranulocítico para neutrofílico, e eosinofílico para misto). Nenhum paciente apresentou algum evento adverso relevantes na indução do escarro.

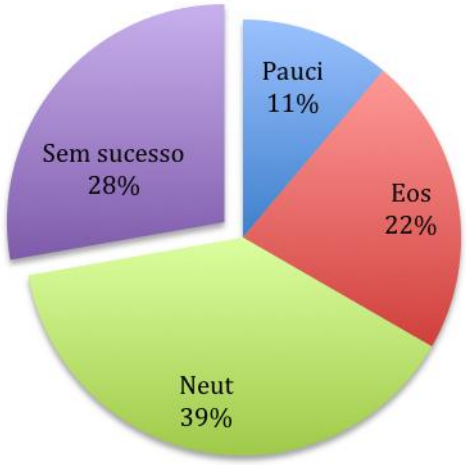


**Figura 3. Taxa de sucesso de obtenção de escarro induzido e distribuição dos padrões de inflamação nas vias aéreas inferiores das crianças estudadas com AGRT**. Pauci: paucigranulocítico; Eos: eosinofílico; Neut: neutrofílico. (n=18)

Dezesseis crianças realizaram tomografia computadorizada de tórax. Em apenas um exame foi encontrado presença de bronquiectasias em pequena escala. Dez pacientes apresentaram alçaponamento aéreo, atelectasias e brônquios de paredes espessadas. Padrão em vidro fosco foi observado em 2 crianças e hérnia de hiato foi um achado ocasional em um paciente. Três (18,8%) crianças apresentaram exame sem alterações.

Dos pacientes estudados 6 eram maiores de 12 anos e apresentaram mais de 5 coletas consecutivas de avaliações do ACT. A Figura 4 ilustra o predomínio de ausência de controle da asma (ACT<20) nas visitas médicas, mesmo com a melhor otimização possível do manejo

da doença no período.

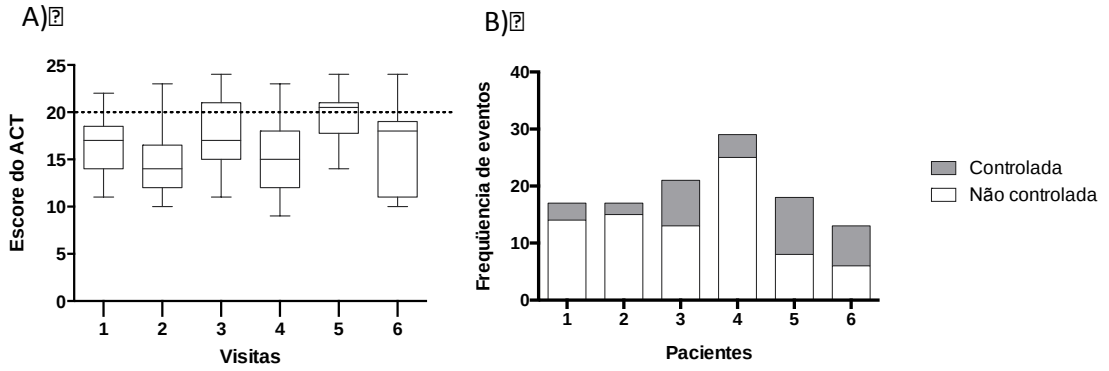


**Figura 5. A) Mediana de escores do Asthma Control test (ACT) em visitas médicas consecutivas de pacientes com asma grave resistente à terapia. B) Freqüencia de episódios de doença não controlada (ACT<20) e controlada (ACT≥20) em crianças com asma grave resistente à terapia.**

## DISCUSSÃO

A asma grave tem sido amplamente estudada e discutida em adultos na última década.[10,18] Múltiplos fenótipos/endótipos tem sido descritos nesta faixa etária, de apresentação clínica complexa, e difícil manejo.[24] Na criança, a asma grave do adulto tem sido chamada mais adequadamente de AGRT, mas somente mais recentemente criaram-se alguns critérios mais consensuais sobre diagnóstico e nomenclatura.[8] Mesmo assim, poucos estudos tem sido publicados descrevendo as características de crianças com AGRT,[11,12] com nenhum proveniente de populações de países em desenvolvimento. Dos poucos mecanismos de doença estudados em crianças com AGRT, destacam-se reduzida resposta linfocitária Th-2, e expressão aumentada e reduzida de IL-33 e IL-10, respectivamente.[13-15] Nosso estudo descreve o fenótipo clínico, pela primeira vez, de crianças com AGRT provenientes de zonas urbanas de uma grande metrópole do sul do Brasil.

Nossa amostra de 21 crianças de idade escolar com AGRT traça um perfil do paciente com uma asma resistente às terapias farmacológicas, mesmo utilizando tratamentos das etapas mais altas de tratamento das diretrizes internacionais e brasileira de asma, uma vez excluídas má técnica inalatória ou adesão ao tratamento e co-morbidades relevantes.[7] Nossos pacientes mostraram geralmente ser de característica atópica, com início precoce da doença, e um percentual de obesidade não desprezível (Tabela 1). Crianças com asma grave parecem apresentar um número menor de fenótipos distintos, quando comparados a adultos.[11,12,24] Aproximadamente 2/3 dos pacientes apresentaram teste cutâneo positivo para algum alérgeno,

predominando muito a sensibilização ao ácaro nesta população urbana de menor renda (Figura 1). Sensibilização a antígenos de gatos, animais e fungos mostraram-se pouco frequentes nessa população, já demonstrado por nosso grupo em um estudo anterior de crianças com asma, provenientes da mesma região.[25] As alterações de tomografia de tórax nos pacientes foram compatíveis com doença obstrutiva brônquica inflamatória crônica. No entanto, os achados mais interessantes do nosso estudo foram em relação a característica da função pulmonar desses pacientes e do perfil inflamatório das vias aéreas.

As espirometrias dos pacientes estudados mostraram, em média, discretas alterações obstrutivas, quando realizadas fora de exacerbações. A asma grave em adultos está muito associada a alterações importantes da função pulmonar, que não são observadas em crianças, como já foi descrito em estudos anteriores. Do ponto de vista da história natural da doença, parece que este comprometimento funcional começa a ser mais relevante no início da idade adulta.[26,27] Isto não significa que alterações patológicas como remodelamento brônquico não iniciem cedo na vida, a princípio na idade pré-escolar, e já presentes então na idade escolar e adolescência, como demonstrado em estudos prévios com biópsias transbrônquicas em lactentes, pré-escolares e adolescentes.[28-30] Considerando que esses pacientes costumam manter sua doença não controlada na maioria das vezes, mecanismos obstrutivos de doença devem ser melhor entendidos nesse grupo de pacientes, para podermos explicar melhor a apresentação clínica e funcional e otimizar tratamento. Uma hipótese para esse achado é que crianças com AGRT apresentam uma labilidade de tônus bronco-motor muito grande, justificando espirometrias poucos alteradas com presença de sintomas frequentes.

O escarro induzido, método não invasivo para avaliar inflamação das vias aéreas inferiores, permite a avaliação da persistência do processo inflamatório na asma através da análise do padrão de celularidade (perfil inflamatório), tendo sido explorado em pesquisas com asma em crianças.[21,31] Obtivemos amostras adequadas para análise em 72% dos casos, com um perfil inflamatório bastante variável, com maior percentual de escarro neutrofílico. Além disso, ao contrário do que se costuma observar em adultos, nossos resultados, junto com achados de outro estudo anterior,[22] parecem mostrar que o perfil inflamatório de crianças com asma grave pode variar com o tempo. O fator mais comum nesta variação parece ser em relação a inflamação de neutrófilos, possivelmente secundária ao maior número de infeções respiratórias virais nesta faixa etária. Mais valorizado em adultos por apresentar características mais estáveis no seu perfil, o escarro induzido não tem sido um exame tão indicado no manejo de crianças com asma grave,[10] mas pode ser uma ferramenta clínica útil

em casos personalizados, particularmente naqueles que demonstrem um fenótipo não atópico neutrofílico.

Uma co-morbidade bastante discutida e valorizada em crianças com asma grave é o RGE. Asma grave e doença do RGE coexistem frequentemente.[8,32] Poucos pacientes nossos apresentaram queixas específicas de RGE (14%), mas quando realizada pHmetria esofágica, um número maior parece apresentar RGE patológico. Tratar ou não esses pacientes com medicamentos para RGE ainda é uma questão não bem definida. No entanto, parece não haver nenhuma melhora clínica respiratória quando tratamento para RGE é implementado em crianças com asma mais grave, e sua indicação tem sido pouco orientada.[8,33]

Após instituição de tratamento adequado, com controle das co-morbidades e boa adesão dos pacientes, aqueles que não alcançaram um aceitável nível de controle nas etapas 4 e 5 das diretrizes do GINA podem ser considerados como pacientes com AGRT.[8,9] Esse pacientes, são um grande desafio clínico, por apresentarem alta taxa de não controle da doença no seu dia-a-dia (Figura 5). Nestes indivíduos, devemos alcançar o melhor nível de controle possível, minimizando os potenciais efeitos adversos das medicações, sempre lembrando que devido às características heterogêneas da doença, o sucesso terapêutico é individualizado.[1] Os pacientes com AGRT apresentam uma reposta pobre aos corticoides e necessitem doses mais elevadas que as doses rotineiramente utilizadas na maioria dos pacientes. Uma alternativa que surgiu nos últimos anos para uso nessas crianças é o omalizumabe, anticorpo anti-IgE monoclonal humanizado e recombinante, que bloqueia um dos domínios da cadeia pesada da porção Fc da IgE livre. Esta alta afinidade à porção Fc da IgE compete com os receptores celulares (mastócitos, basófilos etc.), inibindo a resposta inflamatória específica.[8,9,34] O omalizumabe demonstrou ser em adultos uma terapia segura e efetiva em melhorar o controle da asma e reduzir a necessidade de corticoides inalados e orais.[34] Em uma revisão da Cochrane de 2006, 15 ensaios clínicos foram incluídos e revisados sobre tratamento de omalizumabe, em um total de 3.143 pacientes estudados. Esta revisão demonstrou que pacientes tratados com omalizumabe reduzem a necessidade de uso de CI e tem um menor risco de apresentar exacerbações.[35] Em crianças, os resultados são semelhantes, melhorando bastante a qualidade de vida, com redução significativa das exacerbações. Na nossa amostra de pacientes, 7/8 (88%) crianças apresentaram uma resposta clínica bastante exuberante, redução importante das exacerbações e ausência de hospitalizações após início do tratamento. Não houve nenhum evento adverso relativo a aplicação do omalizumabe nesses pacientes durante o período estudado. Nessa linha de

experiência clínica, um estudo multicêntrico de vida real francês mostrou que crianças com asma grave em uso de omalizumabe reduziram as exacerbações em aproximadamente 72%.[36] Alguns pacientes do nosso estudo sem indicação de omalizumabe (por faixa etária, nível de IgE ou ausência de sensibilização a alergenos), quando sem alternativas terapêuticas para controle da doença, se submeteram a teste terapêutico com macrolídeo (azitromicina) contínuo. Somente um paciente apresentou uma sugestiva resposta clínica a este regime de tratamento. Nenhum tipo de terapia alternativa é utilizada pelo nosso centro de referência, tal como anti-fúngicos, imunomoduladores ou medicamentos citotóxicos. A diretriz mais recente internacional de asma grave em adultos e crianças não recomenda o uso de macrolídeos ou outros fármacos mais alternativos como os mencionados.[10]

A limitação maior do nosso estudo é sua característica retrospectiva. No entanto, para o objetivo de descrever pela primeira vez uma amostra de crianças com AGRT proveniente de uma população de país em desenvolvimento, acreditamos que não seja uma limitação tão relevante, particularmente porque todos os dados e variáveis sempre foram coletados prospectivamente em um banco de dados pelos autores durante as visitas médicas.

Assim, concluindo, nosso estudo pela primeira vez descreve uma amostra de crianças com AGRT de uma população de país em desenvolvimento. Suas características clínicas são semelhantes às de crianças de países desenvolvidos, mas os mecanismos e fatores de risco para as formas mais graves devem ser melhor estudadas, particularmente os aspectos de função pulmonar, inflamação brônquica e mecanismos de doença, em estudos longitudinais e multicêntricos. Finalmente, destacamos que, apesar da AGRT comprometer um percentual menor da população de crianças com asma, esse grupo de crianças apresenta um importante comprometimento da qualidade de vida, com elevados custos para a sociedade, justificando a concentração de futuros investimentos em pesquisa nesse grupo de crianças.

**REFERÊNCIAS**


1. From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). 2014. (Accessed at http://www.ginasthma.org/.)

2. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet 1998;351:1225-32.

3. Sullivan S, Rasouliyan L, Russo P, Kamath T, Chipps B. Extent, patterns, and burden of uncontrolled disease in severe or difficult-to-treat asthma. Allergy 2007;62:126-33.

4. Braman SS. The global burden of asthma. Chest 2006;130:4S-12S.

5. Lang A, Carlsen K, Haaland G, et al. Severe asthma in childhood: assessed in 10 year olds in a birth cohort study*. Allergy 2008;63:1054-60.

6. Hedlin G, Bush A, Carlsen KL, et al. Problematic severe asthma in children, not one problem but many: a GA2LEN initiative. European Respiratory Journal 2010;36:196-201.

7. Lodrup Carlsen KC, Hedlin G, Bush A, et al. Assessment of problematic severe asthma in children. Eur Respir J 2011;37:432-40.

8. Bush A, Saglani S. Management of severe asthma in children. The Lancet 2010;376:814-25.

9. Bush A, Pedersen S, Hedlin G, et al. Pharmacological treatment of severe, therapy-resistant asthma in children: what can we learn from where? European Respiratory Journal 2011;38:947-58.

10. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. Eur Respir J 2014;43:343-73.

11. Payne DN, Qiu Y, Zhu J, et al. Airway inflammation in children with difficult asthma: relationships with airflow limitation and persistent symptoms. Thorax 2004;59:862-9.

12. Bossley CJ, Saglani S, Kavanagh C, et al. Corticosteroid responsiveness and clinical characteristics in childhood difficult asthma. Eur Respir J 2009;34:1052-9.

13. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, et al. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines. J Allergy Clin Immunol 2012;129:974-82 e13.

14. Saglani S, Lui S, Ullmann N, et al. IL-33 promotes airway remodeling in pediatric patients with severe steroid-resistant asthma. J Allergy Clin Immunol 2013;132:676-85 e13.

15. Gupta A, Dimeloe S, Richards DF, et al. Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma. Thorax 2014;69:508-15.

16. Simoes SM, Cunha SS, Barreto ML, Cruz AA. Distribution of severity of asthma in childhood. J Pediatr (Rio J) 2010;86:417-23.

17. Lai CK, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Thorax 2009;64:476-83.

18. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:2341-51.

.19. Loeb JS, Blower WC, Feldstein JF, Koch BA, Munlin AL, Hardie WD. Acceptability and repeatability of spirometry in children using updated ATS/ERS criteria. Pediatr Pulmonol 2008;43:1020-4.

20. Lung function in growth and aging: a united world wide approach (Accessed at http://www.lungfunction.org/.)

21. Gibson P, Henry R, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. European Respiratory Journal 2000;16:1008-15.

22. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. Thorax 2012;67:675-81.

23. Roxo JPF, Ponte EV, Ramos DCB, Pimentel L, Júnior ADO, Cruz ÁA. Validação do Teste de Controle da Asma em português para uso no Brasil. J Bras Pneumol 2010;36:159-66.

24. Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. Clin Exp Allergy 2012;42:650-8.

25. Luisi F, Pinto LA, Marostica L, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM. Persistent pulmonary function impairment in children and adolescents with asthma. J Bras Pneumol 2012;38:158-66.

26. Jenkins HA, Cherniack R, Szefler SJ, Covar R, Gelfand EW, Spahn JD. A comparison of the clinical characteristics of children and adults with severe asthma. Chest 2003;124:1318-24.

27. Bacharier LB, Strunk RC, Mauger D, White D, Lemanske RF, Jr., Sorkness CA. Classifying asthma severity in children: mismatch between symptoms, medication use, and lung function. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:426-32.

28. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:722-7.

29. Saglani S, Payne DN, Zhu J, et al. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:858-64.

30. Payne DN, Rogers AV, Adelroth E, et al. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:78-82.

31. Lex C, Payne DN, Zacharasiewicz A, et al. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility, and inflammatory cell pattern. Pediatr Pulmonol 2005;39:318-24.

32. Thakkar K, Boatright RO, Gilger MA, El-Serag HB. Gastroesophageal reflux and asthma in children: a systematic review. Pediatrics 2010;125:e925-30.

33. Writing Committee for the American Lung Association Asthma Clinical Research Centers, Holbrook JT, Wise RA, Gold BD, Blake K, Brown ED, Castro M, Dozor AJ, Lima JJ, Mastronarde JG, Sockrider MM, Teague WG. Lansoprazole for children with poorly controlled asthma: a randomized controlled trial. JAMA. 2012 Jan 25;307(4):373-81

34. Fried AJ, Oettgen HC. Anti-IgE in the treatment of allergic disorders in pediatrics. Current opinion in pediatrics 2010;22:758-64.

35. Walker S, Monteil M, Phelan K, Lasserson TJ, Walters EH. Anti-IgE for chronic asthma in adults and children. Cochrane Database Syst Rev 2006;2.

36. Deschildre A, Marguet C, Salleron J, et al. Add-on omalizumab in children with severe allergic asthma: a 1-year real life survey. Eur Respir J 2013;42:1224-33.

# CAPÍTULO IV

## 4.1 CONCLUSÕES

### ARTIGO I

Verificamos que o extrato de lisado bacteriano OM-85 administrado no início da vida, em doses humano-equivalentes, não inibiu o desenvolvimento da resposta pulmonar alérgica em camundongos, em relação à contagem total de células, inflamação pulmonar, eosinofilia pulmonar e sanguínea e produção de IgE específica para ovalbumina. Tivemos o cuidado de testar três doses mais próximas da equivalência para uso em humanos, ampliando desfechos de análise utilizando a dose intermediária testada (Fase II). Na fase II, não encontramos diferença de efeito do OM-85 na resposta pulmonar eosinofílica, de citocinas Th2 e Th1 no LBA, nas alterações histopatológicas e na resistência das vias aéreas.

Nosso estudo demonstrou que o uso precoce de OM-85, em doses humano-equivalentes, não exerce um papel de inibição do desenvolvimento da asma em modelo murino. Nossos resultados não estimulam a exploração de estudos utilizando o OM-85 em crianças com fatores de risco para desenvolvimento de asma de origem alérgica no início da vida.

### ARTIGO II

Nossa amostra de 21 crianças de idade escolar com AGRT traça um perfil do paciente com uma asma resistente às terapias farmacológicas, mesmo utilizando tratamentos das etapas mais altas de tratamento das diretrizes internacionais e brasileira de asma, uma vez excluídas má técnica inalatória ou adesão ao tratamento e co-morbidades relevantes. Nossos pacientes mostraram geralmente ser de característica atópica, com início precoce da doença, e um percentual de obesidade não desprezível.

Aproximadamente 2/3 dos pacientes apresentaram teste cutâneo positivo para algum alérgeno, predominando muito a sensibilização ao ácaro nesta população urbana de menor renda. Sensibilização a antígenos de gatos, animais e fungos mostraram-se pouco frequentes nessa população. As alterações de tomografia de tórax nos pacientes foram compatíveis com doença obstrutiva brônquica inflamatória crônica. No entanto, os achados mais interessantes

do nosso estudo foram em relação a característica da função pulmonar desses pacientes e do perfil inflamatório das vias aéreas, pois as espirometrias dos pacientes estudados mostraram, em média, discretas alterações obstrutivas, quando realizadas fora de exacerbações. Obtivemos amostras adequadas de escarro para análise em 72% dos casos, com um perfil inflamatório bastante variável, com maior percentual de escarro neutrofílico.

Na nossa amostra de pacientes, 7/8 (88%) crianças apresentaram uma resposta clínica bastante exuberante ao omalizumab com redução importante das exacerbações e ausência de hospitalizações após início do tratamento. Não houve nenhum evento adverso relativo a aplicação desta droga nesses pacientes durante o período estudado.

Alguns pacientes do nosso estudo sem indicação de omalizumabe (por faixa etária, nível de IgE ou ausência de sensibilização a alergenos), quando sem alternativas terapêuticas para controle da doença, se submeteram a teste terapêutico com macrolídeo (azitromicina) contínuo. Somente um paciente apresentou uma sugestiva resposta clínica a este regime de tratamento. Nenhum tipo de terapia alternativa é utilizada pelo nosso centro de referência, tal como anti-fúngicos, imunomoduladores ou medicamentos citotóxicos.

Assim, concluindo, nosso estudo pela primeira vez descreve uma amostra de crianças com AGRT de uma população de país em desenvolvimento. Suas características clínicas são semelhantes às de crianças de países desenvolvidos, mas os mecanismos e fatores de risco para as formas mais graves devem ser melhor estudadas, particularmente os aspectos de função pulmonar, inflamação brônquica e mecanismos de doença, em estudos longitudinais e multicêntricos. Finalmente, destacamos que, apesar da AGRT comprometer um percentual menor da população de crianças com asma, esse grupo de crianças apresenta um importante comprometimento da qualidade de vida, com elevados custos para a sociedade, justificando a concentração de futuros investimentos em pesquisa nesse grupo de crianças.

# ANEXOS

## **ANEXO 1**- APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS

Plataforma Brasil

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Asma de difícil controle: aspectos clínicos, funcionais, radiológicos, de marcadores inflamatórios e de qualidade de vida.

**Pesquisador:** Paulo Márcio Condessa Pitrez

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 32908514.5.0000.5336

**Instituição Proponente:** UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

**Patrocinador Principal:** UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 826.860

**Data da Relatoria:** 25/10/2014

**Apresentação do Projeto:**

Ver conclusões.

**Objetivo da Pesquisa:**

Ver conclusões.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Ver conclusões.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Ver conclusões.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Ver conclusões.

**Recomendações:**

O relator gostaria de destacar que procurou apresentar sugestões para que o CEP pudesse aprovar este "Projeto de Pesquisa" em que um dos autores identifica-se como aluno de Doutorado. Pensávamos que se tratava do Projeto de tese, mas segundo informações do Orientador trata-se apenas de um estudo descritivo do qual resultará um artigo original.

O CEP não analisa projetos de estudos já realizados, por este motivo, sugerimos a modificação do

**Endereço:** Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS

Continuação do Parecer: 826.860

delineamento da pesquisa.

Quanto as considerações finais do investigador principal do projeto gostaríamos de destacar a maneira como assumimos nosso papel como membro deste conceituado CEP de acordo com a legislação vigente.

RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012.

VII – DO SISTEMA CEP/CONEP

É integrado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP/CNS/MS do Conselho Nacional de Saúde e pelos Comitês de Ética em Pesquisa – CEP - compondo um sistema que utiliza mecanismos, ferramentas e instrumentos próprios de inter-relação, num trabalho cooperativo que visa, especialmente, à proteção dos participantes de pesquisa do Brasil, de forma coordenada e descentralizada por meio de um processo de acreditação....

VII.1 - Pesquisas envolvendo seres humanos devem ser submetidas à apreciação do Sistema CEP/CONEP, que, ao analisar e decidir, se torna corresponsável por garantir a proteção dos participantes.

VII.2 - Os CEP são colegiados interdisciplinares e independentes, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criados para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos:

VII.4 - A revisão ética dos projetos de pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser associada à sua análise científica.

Segundo Gracia (2000) pode-se estabelecer como um princípio geral que todo estudo tecnicamente incorreto também o é eticamente, porém o contrário não é certo, pois um estudo tecnicamente correto poderá não ser eticamente bom.

Gracia D. Medicina baseada en la evidencia:aspectos éticos. Bioética/Conselho Federal de Medicina 2000:8 (1):79-87.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os autores realizaram modificações e forneceram justificativas, quanto ao questionamento do relator.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS

Continuação do Parecer: 826.860

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PORTO ALEGRE, 10 de Outubro de 2014

**Assinado por:**
**Rodolfo Herberto Schneider**
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br