

Artigo de Revisão

Review Article

Luísa Geraldes¹
Ana Todo-Bom²
Carlos Loureiro²

Avaliação da inflamação das vias aéreas. Vias áreas superiores e compartimento broncopulmonar

Airways inflammation evaluation. Upper and lower airways

Recebido para publicação/*received for publication*: 08.12.12
Aceite para publicação/*accepted for publication*: 09.01.12

Resumo

Faz-se uma revisão sobre métodos de avaliação da inflamação nas vias aéreas que contribuam para o diagnóstico, terapêutica e prognóstico de patologias como a rinosinusite e a asma. Serão também considerados métodos susceptíveis de fornecer informação relevante sobre inflamação na DPOC.

A inflamação crónica das vias aéreas condiciona fenómenos obstructivos objectivados na função respiratória basal, na hiperreactividade brônquica e nasal e em quadros clínicos de dificuldade respiratória. A tomografia computadorizada informa sobre as dimensões do lúmen, a espessura das paredes brônquicas e os índices de densidade pulmonar, alterações que decorrem da inflamação e remodelação das vias aéreas.

Abstract

It is done a review of evaluation methods of the inflammation in upper airways and bronchi used for diagnosis, therapeutic approach and prognosis of pathologies like rhinosinusitis and asthma. It is also analysed methods that supply relevant information of inflammation in COPD.

The chronic inflammation of the airways is associated to respiratory distress, obstruction in basal lung function tests and to bronchial and nasal hyperreactivity. Computerized tomography informs about lumen dimensions, bronchial walls thickness and pulmonary density. These changes are associated to inflammation and to remodelling of the airways. Localized inflammation in respiratory tract can be

¹ Interna do 5.º ano da especialidade de Imunoalergologia dos HUC

² Assistente Hospitalar Graduado em Imunoalergologia dos HUC

Serviço de Imunoalergologia
Departamento de Ciências Pneumológicas e Alergológicas dos Hospitais da Universidade de Coimbra
Av. Bissaya Barreto e Praceta Prof. Mota Pinto
3000-075 Coimbra

Um processo inflamatório localizado nas vias respiratórias é susceptível de ser detectado por modificações em marcadores sistémicos de inflamação.

Os métodos directos recorrem a análise imunoistoquímica de tecidos e de fluidos em condições basais ou após estimulação. Os eosinófilos aumentam em biópsias, lavados nasais e broncoalveolares na asma e na rinite e modificam-se com a terapêutica. Ocorrem alterações nas proteínas e expressão de RNAm de mediadores envolvidos na activação celular.

A expectoração induzida identifica inflamação eosinofílica que se relaciona inversamente com a função ventilatória.

Em cada ciclo respiratório o ar é enriquecido em compostos voláteis produzidos no decurso da respiração celular. A FENO é o biomarcador mais estudado e os seus níveis estão elevados na asma.

No condensado do ar expirado identificam-se espécies reactivas de oxigénio, derivados de membrana, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

Se a avaliação não invasiva da inflamação for fidedigna e reprodutível, será imprescindível na monitorização das doenças das vias aéreas.

Rev Port Pneumol 2009; XV (3): 443-460

Palavras-chave: Asma, exames auxiliares de diagnóstico, inflamação, rinite.

detected by modifications of systemic inflammatory markers.

The direct evaluation of inflammatory airways changes are based on immune, histological and chemical analysis of lung tissue obtained by biopsies and by fluids recoil in basal conditions or after stimulation. The eosinophils are increased in biopsies and in nasal and bronchoalveolar lavage in asthma and rhinitis and can change with therapy. Proteins and mRNA expression of cellular activation mediators are also observed.

The induced sputum identifies eosinophilic inflammation that is inversely associated with lung function parameters.

In each respiratory cycle the air is enriched in organic volatile compounds produced by cellular breathing. FENO is the bio marker more deeply studied in asthma and its increase is well documented in this disorder.

In the exhaled air condensed, reactive oxygen species, membrane mediators, cytokines, and chemokines are identified.

If the non invasive evaluation of inflammation became reliable and reproducible it will be indispensable in monitoring the airways diseases.

Rev Port Pneumol 2009; XV (3): 443-460

Key-words: Asthma, evaluation methods, inflammation, rhinitis.

Introdução

A inflamação das vias aéreas pode condicionar modificações anatómicas e funcionais localizadas e ainda modificações sistémicas susceptíveis de serem detectadas no sangue e noutros órgãos ou sistemas. Uma avaliação mais direccionada para as vias aéreas incidirá directamente nas modificações ocorridas

a esse nível. Pelo contrário, as alterações observadas a nível sistémico têm de ser enquadradas em contexto clínico particular, tendo em especial atenção a possível existência de comorbilidades. A quantificação objectiva dessas modificações constitui, desde há vários anos, um enorme desafio, já que a sua concretização abriria enormes expectativas

no diagnóstico e na terapêutica de algumas doenças.

As doenças inflamatórias crónicas das vias aéreas, como asma brônquica, rinossinusite e doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) manifestam-se por obstrução com graus de intensidade e reversibilidade variáveis. Nas duas primeiras situações, o grau de inflamação é determinante para o prognóstico, já que condiciona fortemente a evolução clínica e a funcionalidade de órgão. Na DPOC, a componente inflamatória, embora presente, tem um contributo mais marginal para o processo evolutivo, que depende mais directamente da agressão promovida por enzimas proteolíticas e radicais oxidativas das células fagocíticas^{1,2}.

A fibrose quística é outra situação clínica em que ocorre inflamação e obstrução das vias aéreas. Tem carácter sistémico com envolvimento preferencial do aparelho digestivo, aparelho genital e das vias aéreas, onde ocorrem processos infecciosos graves recorrentes. A avaliação da expressão da inflamação das vias aéreas nesta doença tem algum interesse em situações particulares, já que pode permitir adequar a medicação, mas a intervenção mais eficaz passa por uma avaliação mais global da doença.

Os bronquíolos são as extremidades das vias aéreas e, por isso, estão em contacto íntimo com o interstício pulmonar. As bronquiolites surgem no contexto de doenças das vias aéreas inferiores, como asma e DPOC, e de doenças próprias do interstício, como infecções, doenças do tecido conjuntivo, pneumonites de hipersensibilidade, vasculites, pneumonia eosinofílica crónica ou fibrose pulmonar idiopática. De um modo geral, as biópsias de tecido pulmonar (transtorácicas ou cirúrgicas) são fundamentais para o diag-

nóstico da avaliação da inflamação das vias aéreas, proporcionando uma informação limitada e, conseqüentemente, inadequada para o estudo destas patologias.

As bronquiectasias e a doença bolhosa do pulmão são consideradas causas de obstrução brônquica, mas o seu estudo deverá ser enquadrável na etiologia e na patogenia diversa subjacentes à sua expressão.

Existe uma entidade designada bronquite eosinofílica crónica, associada a infiltrado eosinofílico das vias aéreas, que clinicamente se caracteriza por episódios de tosse recorrente, mas sem sibilância, e que também é objecto da avaliação de inflamação³.

Assim, na presente revisão será privilegiada a análise crítica de métodos de avaliação da inflamação que contribuam para o enquadramento diagnóstico, atitude terapêutica e prognóstico evolutivo da rinossinusite e asma, sendo discutidos métodos de avaliação da inflamação dirigidos à DPOC sempre que a sua inclusão se considere pertinente para a presente discussão.

Clínica, função e imagem

A inflamação crónica das vias aéreas condiciona fenómenos obstrutivos caracterizados do ponto de vista clínico por dificuldade respiratória de localização, intensidade e duração variáveis. O conhecimento da fisiopatologia das doenças respiratórias permite aceitar que a inflamação das vias aéreas determine também, na maioria dos casos, estudo funcional respiratório basal de obstrução, assim como hiperreactividade brônquica e nasal específica e inespecífica. Embora existam situações de hiperreactividade sem inflamação, as provas de provocação constituem métodos utilizados na avaliação indi-

recta da inflamação das vias aéreas superiores e inferiores. A análise dos graus de obstrução é eventualmente complementada por informação das modificações de imunistoquímica ocorridas no decurso deste processo.

A hiperreactividade brônquica (HRB) define-se como um estreitamento excessivo das vias aéreas em resposta a vários estímulos inalados e pode ser reproduzida em laboratório através da realização de testes de provocação brônquica padronizados. A HRB é uma característica da asma que se relaciona com a sua inflamação e gravidade, mas também com a remodelação das vias aéreas. A terapêutica anti-inflamatória continuada durante três meses pode ser suficiente para melhorar parâmetros clínicos e de função ventilatória basal, como o *forced expiratory volume in the first second* (FEV₁), e para reduzir o número de eosinófilos em biópsias e no líquido do lavado broncoalveolar (LBA). Contudo, como se pode revelar incapaz de modificar proporcionalmente a HRB, essa observação reforça a teoria de que a HRB reproduza também modificações na remodelação brônquica que, quando instalada, tem uma resposta mais limitada à terapêutica convencional⁵.

A HRB está também presente na DPOC agudizada. Existe HRB à metacolina em 65 a 90% dos casos de DPOC, sendo os valores mais elevados encontrados no sexo feminino. O tabagismo, altamente associado à patogénia da DPOC, constitui um risco independente para o desenvolvimento de HRB inespecífica. A HRB pode existir em indivíduos saudáveis e os estudos epidemiológicos sugerem que pode também existir em 6 a 35% da população geral, mesmo na ausência de sintomas respiratórios^{6,7,8}.

Para a avaliação da HRB inespecífica podem considerar-se testes directos e indirectos. Nos testes directos, são usados, para provocação, agentes farmacológicos como a histamina e a metacolina, que actuam directamente nos receptores do músculo liso e causam constrição. Os testes indirectos incluem estímulos físicos como o exercício, hiperventilação eucápnica, ar frio, soluções salinas hipertónicas ou água destilada e, ainda, estímulos químicos, como o manitol e o monofosfato de adenosina. Estes agentes provocam broncoconstrição pela indução da libertação de mediadores por células inflamatórias ou por estimulação de terminais nervosos nas vias aéreas. As variações osmóticas, na medida em que avaliam a libertação de mediadores celulares, parecem ser mais informativas na avaliação da inflamação. A provocação com manitol é considerada muito específica no diagnóstico de inflamação na asma, constituindo-se ainda um factor preditivo na resposta à corticoterapia⁹.

Consideradas as limitações referidas no estudo de HRB, pode ainda proceder-se à avaliação da resposta imediata, tempo de recuperação e resposta tardia nas provocações específicas do antigénio. Estas provas, quando correctamente interpretadas, têm interesse para avaliação da inflamação das vias aéreas, particularmente nas situações de asma profissional. A sua informação pode ser complementada, particularmente em investigação, por outras determinações discutidas neste artigo.

As provas de provocação nasal são usadas geralmente em investigação e mais raramente na clínica, particularmente na rinite ocupacional. Podem ser específicas, e aí dependentes do tipo do alergénio, e não específicas, usando, neste caso, estímulos como histamina, metacolina, ar frio, cininas, capsaicina, ou outros que desencadeiam hipersecreção.

A determinação de mediadores como histamina, prostaglandina (PG) D₂, cisteinil-leucotrienos, cininas, triptase e proteína catiónica eosinofílica (*eosinophilic cationic protein* – ECP) libertados, durante a provocação, para as secreções nasais, sangue ou urina, pode ter grande utilidade¹⁰.

A tomografia computadorizada (TC) tem sido utilizada para avaliar as dimensões das vias aéreas centrais na asma, permitindo determinar a sua área total, a área do lúmen de segmentos específicos e a espessura das paredes brônquicas. Admite-se que estas modificações constituam avaliações indirectas da inflamação e da remodelação que ocorrem nas grandes vias aéreas. As paredes das vias aéreas centrais dos asmáticos têm aumento da espessura comparativamente com as dos saudáveis, e esse aumento tem sido directamente correlacionado com gravidade da doença, grau de obstrução e outros biomarcadores da inflamação, como a HRB.

A espessura aumentada reflecte o espessamento da membrana basal, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso por proliferação de miofibroblastos, aumento no número e dimensão das glândulas mucosas e angiogénese. A intervenção terapêutica eficaz associa-se a melhoria clínica da função ventilatória, bem como melhoria de outros parâmetros de avaliação da inflamação, como os valores da fracção exalada de óxido nítrico (*fractionated exhaled nitric oxide* – FENO), mas não determina obrigatoriamente, numa consequente redução em TC da espessura da parede das vias aéreas, aliás como acontece com a variação da HRB¹¹. Foi, aliás, observado em crianças um aumento da espessura das vias aéreas, mas sem correlação com a gravidade da asma ou com

a função respiratória, sugerindo que alterações importantes possam surgir em períodos estáveis da doença¹².

Uma aproximação alternativa à metodologia descrita para avaliação imagiológica das vias aéreas centrais, destinada à avaliação de vias aéreas mais periféricas, envolve a obtenção de imagens em expiração avaliando a extensão e o grau de zonas de atenuação da trama pulmonar (hipotransparentes) que corresponderão a zonas de hiperinsuflação por retenção de ar. Em adultos, estas alterações em TC, embora não constituam um indicador fidedigno de inflamação, parecem correlacionar-se com a gravidade da asma e com o grau de obstrução periférica¹³. Áreas de baixa densidade em imagens de TC obtidas de crianças asmáticas em expiração máxima correlacionam-se fortemente com volume residual e com o valor de FENO na asma moderada¹⁴.

Os índices de densidade pulmonar, obtidos a partir da percentagem de campo pulmonar ocupado por áreas de baixa densidade relativamente a áreas de densidade pulmonar média, têm sido estudados na asma em inspiração comparativamente à expiração, fase em que estes índices diminuem. Foi observada uma associação inversa entre o grau de densidade pulmonar conseguida pela expiração (comparativamente à inspiração) e a obstrução das vias aéreas. Estes resultados sugerem o uso da TC em inspiração/expiração como um método interessante na avaliação da inflamação das pequenas vias aéreas. A obstrução deste segmento resulta numa maior HRB e maior gravidade, susceptível de motivar intervenção terapêutica adequada^{15,16}. O uso de TC tridimensional, mais sensível do que a bidimensional, pode melhorar a avaliação das pequenas vias aéreas.

A irradiação do doente constitui o principal inconveniente da TC como método de rotina. Imagens pulmonares com recurso a técnicas de ressonância magnética com hélio-3 hiperpolarizado parecem promissoras na avaliação das alterações da distribuição de gás no pulmão¹⁷.

Marcadores sistémicos de inflamação

Um processo inflamatório comum localizado nas vias respiratórias, como por exemplo uma rinosinusite ou uma bronquite aguda, é susceptível de ser detectado por modificações a nível de marcadores sistémicos de inflamação. Os valores de leucócitos no sangue e a percentagem relativa das diferentes linhas de granulócitos e de mononucleares e a VSG podem estar alterados.

A leucocitose com eosinofilia está associada a situações de inflamação alérgica. A proteína catiónica eosinofílica, uma proteína associada à activação eosinofílica, pode ser determinada no sangue para monitorizar a inflamação alérgica.

As proteínas da resposta inflamatória positiva, como a ceruloplasmina, as fracções C3 e C4 do complemento, o inibidor C1 esterase (do grupo I), a α -1 glicoproteína ácida ou orosomucóide, a haptoglobina, o fibrinogénio, a α -1 antitripsina, a α -1 antiqumiotripsina (do grupo II), a proteína C reactiva (PCR) e a substância sérica amiloide A (do grupo III) podem aumentar as suas concentrações plasmáticas em resposta a situações inflamatórias ou de *stress* decorrentes de traumatismos, agressões infecciosas ou outras. A albumina, a pré-albumina e a transferrina são proteínas negativas da fase aguda da inflamação porque, no decur-

so destes processos, são sintetizadas em menor quantidade.

Estão descritos aumentos dos valores de PCR em asmáticos que se correlacionam com os valores de função ventilatória^{18,19}.

Na inflamação neurogénica podem estar elevados, a nível sistémico, neuropeptídeos, como a substância P (SP), a neurocinina A (*neurokinin A* – NKA) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (*calcitonin gene related peptide* – CGRP). A elevação destes neuropeptídeos resulta no aumento compensatório dos seus reguladores, com acção enzimática, que promovem a sua inactivação, como a endopeptidase neutra (*neutral endopeptidase* – NEP) e a dipeptil peptidase IV (DPP IV).

Embora esta avaliação não permita localizar o processo inflamatório quando analisado num contexto clínico específico, poderá fornecer informação fidedigna sobre a inflamação do órgão onde ocorreram as manifestações clínicas^{20,21}.

Marcadores localizados da inflamação

Estão descritos métodos directos e indirectos para avaliar a inflamação das vias aéreas. Os métodos directos são os que dão informação mais fidedigna, pois recorrem a colheita, para análise imunoistoquímica, de tecidos e de fluidos hipoteticamente no local onde está a ocorrer o processo inflamatório. Uma vez que as vias aéreas inferiores não estão expostas ao exterior, as recolhas de material biológico dirigidas a esses segmentos da árvore respiratória exigem procedimentos invasivos. Este facto limita a sua aplicação a alguns casos particulares. O material recolhido pode ser analisado em condições basais

ou pode ser objecto de estimulação, de forma a quantificar modificações ocorridas durante os processos de estimulação.

Métodos directos

Biópsias brônquicas e nasais. Citologia brônquica e nasal

Estruturalmente, a parede das vias aéreas é formada por epitélio pseudoestratificado cilíndrico com células caliciformes e células claras. A camada epitelial assenta sobre uma membrana basal que a separa da submucosa com tecido conjuntivo, vascular e nervoso, das glândulas mucosas, da camada muscular e da cartilagem. Apesar das vias aéreas superiores e inferiores terem origem embriológica distinta, a maior diferença funcional observada no nariz relaciona-se com a grande riqueza de capilares subepiteliais e com a presença de seios cavernosos sinusóides, assim como a ausência do anel de fibra muscular lisa que caracteriza a parede brônquica. A avaliação da inflamação das vias aéreas inferiores através de estudo histológico pode ser realizada com auxílio de um broncofibroscópio que permite a execução de biópsias. Este procedimento técnico diagnóstico permitirá igualmente a realização de escovado para estudo citológico e lavagem broncoalveolar para análise de celularidade e de mediadores no sobrenadante, procedimentos capazes de fornecer informação valiosa sobre a inflamação brônquica. A avaliação da inflamação nasal pode também ser concretizada através de biópsias preferencialmente elaboradas ao nível do corneto inferior, assim como por citologia e por lavagem nasal, sendo estes procedimentos mais simples e, por isso, mais fáceis de executar. Estes

exames, brônquicos e nasais, podem ser efectuados em condições basais ou após a realização de testes de provocação.

O estudo histológico de tecidos obtidos por biópsia é o *gold standard* para avaliação da inflamação. A sua principal desvantagem reside no facto de permitir apenas a análise limitada de zonas superficiais das vias respiratórias, como o epitélio, a membrana basal e áreas da submucosa. Outra limitação das biópsias brônquicas é a incapacidade de examinar bronquíolos com diâmetro inferior a 3 mm. Na asma, a inflamação e a remodelação ocorrem precocemente e condicionam, de forma sequencial ou paralela, a descamação do epitélio, depósitos de colagénio e espessamento da membrana basal, aumento do número, dimensão e área de distribuição das glândulas secretoras de muco, hipertrofia do músculo liso brônquico e neovascularização. Estas alterações estão associadas à presença de células inflamatórias, como mastócitos, basófilos, linfócitos T CD4, do subtipo Th2, e de polimorfonucleares eosinófilos e neutrófilos infiltrados na parede ou presentes no lúmen brônquico. A inflamação eosinofílica que caracteriza a asma parece constituir um pré-requisito para que ocorra remodelação. A presença de mastócitos activados a nível do músculo liso brônquico permite distinguir histologicamente a asma da bronquite eosinofílica crónica^{22,23}.

As biópsias nasais na rinite alérgica mostram acumulação de mastócitos, eosinófilos e basófilos no epitélio da mucosa nasal e de eosinófilos na lâmina própria profunda. A membrana basal reticular pode aparecer espessada, embora não tanto como ocorre na asma, provavelmente pela ausência de células musculares e pelas suas origens embriológicas diferentes.

Na DPOC, os achados histológicos são diferentes. Existe um envolvimento preferencial das vias aéreas mais periféricas com metaplasia escamosa do epitélio, hiperplasia das células caliciformes e das glândulas submucosas, infiltrado das vias aéreas por macrófagos, linfócitos T CD8, fibroblastos e neutrófilos. Observa-se muco no lúmen brônquico um discreto aumento do músculo liso e fibrose peribrônquica quase sem alterações a nível da membrana basal.

A biópsia é a única técnica que permite a realização de estudos de imunoistoquímica, fornecendo informação sobre modificações que ocorrem nas células tecidulares. Permite a análise directa de proteínas, particularmente receptores e ligandos, membranares e intracelulares, envolvidas em processos de activação celular e a realização de estudos de expressão génica por extracção de RNAm do material biológico recolhido^{24, 25, 26, 27, 28}.

Não está completamente estabelecida a associação entre inflamação observada em biópsias brônquicas e a gravidade clínica. Aspectos particulares, como a expressão de citocinas e de quimiocinas, têm sido estudados com o objectivo de avaliar essas possíveis associações e com o objectivo de clarificar aspectos fisiopatológicos da inflamação na doença. Neste âmbito, um trabalho recente analisa em células obtidas por biópsia e em células do sangue a expressão de receptores CCR6 com reconhecida intervenção no processo alérgico após provas de provocação específica com alérgenos. O CCR6 estava expresso em valores elevados em linfócitos CD4 comparativamente com os CD8, nos tecidos, comparativamente ao sangue. As células que expressavam CCR6 tinham respostas funcionais mais acentuadas ao CCL20, que aumentava no lavado

broncoalveolar (LBA) após provocação. A partir deste trabalho realizado em biópsias, foi possível concluir sobre a importância do CCL20 na resposta à exposição alérgica e que o seu aumento pode promover o recrutamento e retenção de células T efectoras na inflamação alérgica através da expressão de CCR6²⁹.

Foi também determinada, num outro trabalho recente, a expressão proteica e a síntese induzida por RNAm local de receptores de cisteinil leucotrienos a partir de tecido brônquico obtido de biópsias de doentes asmáticos, tendo sido demonstrado que a sua expressão estava aumentada em asmáticos e se relacionava directamente com a gravidade.

A análise direccionada para a intervenção farmacológica demonstrou que a persistência de inflamação eosinofílica não reversível com terapêutica com corticosteróides estava associada a uma expressão aumentada nas vias aéreas da isoforma β do receptor de corticosteróides conotada com resistência a este grupo farmacológico.

A biópsia pode pois fornecer informação relativa ao grau de inflamação em diferentes patologias, à potencial modificação da gravidade e à resposta à terapêutica, reservando-se a sua utilização para situações clínicas particulares e para investigação.

Os estudos citológicos brônquicos, embora forneçam informação relativa à composição celular do muco, são mais dirigidos ao rastreio de patologia neoplásica pulmonar. Apesar de permitirem uma observação mais extensa da árvore brônquica, a informação que fornecem tem muitas limitações, pelas enormes variações individuais que lhe são reconhecidas. A sua recolha exige metodologia invasiva, o que, face à reduzida informação que dispensa, limita a sua utilização.

A citologia do esfregaço nasal é simples e dirige-se à superfície mucosa, permitindo a avaliação relativa das diferentes populações celulares. Os resultados da citologia e da biópsia nasal são comparáveis e, embora a segunda dê uma imagem mais real, a citologia tem a vantagem de poder ser usada em estudos em série, por ser mais simples, menos incómoda e reprodutível.

A citologia nasal distingue rinopatias inflamatórias das não inflamatórias; as alérgicas das não alérgicas; as infecciosas bacterianas das víricas (identificação de bactérias e de vírus), segue o curso da doença e a resposta ao tratamento. Uma citologia nasal normal inclui sempre numerosas células epiteliais, (colunares ciliadas e não ciliadas), caliciformes e células basais. Não deverão existir eosinófilos ou basófilos nas camadas superficiais acima da membrana basal. Podem observar-se alguns neutrófilos e bactérias, principalmente se a recolha é efectuada na porção anterior do corneto inferior.

A eosinofilia nas secreções é portanto sinal de alteração, uma marca reprodutível de alergia na rinite que estabelece boas correlações com a clínica. O número de eosinófilos nas secreções nasais correlaciona-se de modo particular com a intensidade da exposição alérgica, com o valor de IgE sérica e com a obstrução nasal avaliada por rinomanometria. Outros grupos celulares, como os linfócitos CD4CD25 e respectivas citocinas, aumentam nas secreções nasais com a provocação alérgica em doentes com rinite. Estas modificações são susceptíveis de ser avaliadas através do RNAm, observando-se um aumento da expressão de interleucina (IL) 3, IL4, IL5, GM-CSF (*granulocyte macrophage – colony stimulating factor*) (e não de IL2 e de INF γ) com a pro-

vocação alérgica local. A exposição natural também motiva alterações no mesmo sentido^{30,31,32}.

Lavado broncoalveolar e lavado nasal

Os estudos de celularidade a partir do LBA podem informar sobre inflamação das vias aéreas em condições basais, mas a rentabilidade da sua informação é mais elevada quando o LBA é realizado após exposição a desencadeantes de forma natural, ou induzida em laboratório, provocando quadros de obstrução brônquica. Observa-se aumento do número de eosinófilos e de neutrófilos na asma de difícil controlo. Contudo, o número de agudizações graves e a necessidade de recurso a corticosteróides orais correlaciona-se de forma mais directa com o valor percentual de eosinófilos no LBA. Os linfócitos T, particularmente do fenótipo CD4, bem como as citocinas linfocitárias, também estão aumentados nos LBA, particularmente após provocação específica. Recentemente, foram identificados RNAm de IL9 e proteína IL9 aumentados no LBA após a provocação alérgica em indivíduos atópicos, tal como tem sido demonstrado para outras interleucinas características do perfil linfocitário Th2³³.

Os estudos de LBA têm sido usados em investigação, procurando clarificar aspectos fisiopatológicos da asma brônquica com diferentes graus de gravidade, bem como fornecer indicações sobre intervenção terapêutica. Grupos celulares obtidos a partir de LBA e submetidos a estimulação *in vitro* fornecem informação sobre casos específicos. Num estudo recente, macrófagos obtidos a partir de lavagem broncoalveolar foram expostos a lipopolissacarídeos (LPS) e a corticosteróides

e nos sobrenadantes foi efectuada a determinação de citocinas. Foi também avaliada a actividade p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), uma importante via de sinalização envolvida na produção de mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos. Neste estudo foi demonstrado que a capacidade de inibição da dexametasona na libertação de IL-1 β , IL-6, IL-8, *monocyte chemotactic protein* (MCP)-1 e de *macrophage inflammatory protein alpha* (MIP-1 α) induzida por LPS foi significativamente inferior em macrófagos de doentes com asma grave, comparativamente com os de doentes com asma ligeira. Observou-se ainda aumento da activação de p38 MAPK em macrófagos de doentes com asma grave, permitindo concluir que os macrófagos alveolares de doentes com asma grave demonstram insensibilidade aos corticosteróides associada ao aumento da activação de p38 MAPK³⁴.

Outro trabalho recente avalia a densidade à superfície e o estado de activação de integrinas expressas em eosinófilos do sangue e obtidos do LBA de asmáticos após provocação específica com alérgenos. O aumento da expressão de integrinas observado em eosinófilos, 48 horas após provocação, correlacionava-se com a queda do FEV₁ na reacção tardia, com os valores de IL-5 e com a percentagem de eosinófilos determinados no LBA. Assim, antes da provocação, as integrinas dos eosinófilos circulantes têm reduzida densidade de expressão e reduzido estado de activação. Com a provocação alérgica, os eosinófilos circulantes adoptam um fenótipo de activação facilitador da sua deslocação em direcção aos receptores VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) dos vasos brônquicos. No ambiente das vias aéreas rico em IL-5, os eosinófilos adquirem maior capacidade de ade-

são e permanência, aumentando a expressão de integrinas³⁵.

Apesar do contributo científico que numerosos trabalhos nesta área têm dado desde há vários anos, o uso clínico do LBA na avaliação das vias aéreas não tem indicação devido à limitação da sua aplicação em procedimentos de rotina.

A lavagem nasal é simples de efectuar, bem tolerada e pode dar informação sobre recrutamento de células para o lúmen, activação celular e extravasamento de proteínas plasmáticas. É, tal como a citologia, facilmente aplicável na prática clínica.

A lavagem nasal permite avaliar as respostas imediatas e tardias à provocação alérgica e ainda as modificações ocorridas com a provocação com outros estímulos, como histamina, bradicinina, capsaicina, metacolina e substância P, que têm efeitos na vascularização, na secreção glandular, no recrutamento e na activação celular. A intervenção de mediadores específicos, como IL-8, eotaxina, e CCL5 (RANTES), na resposta alérgica tardia, também pode ser avaliada.

Em condições naturais, os estudos têm demonstrado ausência de aumento nas concentrações de histamina no lavado nasal na rinite alérgica sazonal (*seasonal allergic rhinitis* – SAR) ou na rinite alérgica perene (*perennial allergic rhinitis*) comparativamente a controlos, ao contrário da triptase, da PGD₂ e da PGE₂, que estão aumentadas na SAR e na PAR.

Existe aumento de eosinófilos e das proteínas eosinofílicas, como a ECP e a peroxidase eosinofílica, no lavado nasal na SAR ou na PAR, que se correlacionam com o *score* de sintomas.

Têm também sido referidos aumentos no lavado nasal de citocinas e quimiocinas rela-

cionadas com a inflamação eosinofílica (IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, INF γ , CCL5, GM-CSF e *macrophage inflammatory protein* – MIP-1 α), sendo as modificações mais relevantes observadas após provocação.

O lavado nasal tem também sido usado para avaliar a formação e a libertação de metaloproteases, elastases e inibidores das proteases, como α 1-antitripsina.

De acordo com alguns estudos, existe uma correlação fraca entre a hiperreactividade nasal avaliada pela resposta à histamina e os eosinófilos no lavado nasal. Outros estudos mostram correlações fortes entre os níveis de triptase no lavado e a percentagem de eosinófilos nos esfregaços nasais, assim como da ECP no lavado, e o número de eosinófilos na superfície mucosa. Foi também demonstrada correlação entre o ECP e derivados de NO após provocação^{36,37,38}.

Expectoração induzida

A mucosa respiratória é revestida por uma camada mucosa com funções de protecção e defesa. Em situações de inflamação, esse muco sofre modificações na sua quantidade e composição. Uma vez que os batimentos ciliares tendem a empurrá-lo para o exterior, constitui material biológico susceptível de ser analisado como um marcador de inflamação. Na impossibilidade de a recolha espontânea abranger as vias aéreas mais periféricas, essa recolha pode ser efectuada através da expectoração induzida com inalação de soluções salinas hipertónicas.

A sua análise permite identificar inflamação eosinofílica que estabelece relações de associação directa com valores mais reduzidos de FEV₁, em provas basais e de PC20, em

provas de provocação inespecífica. O aumento de neutrófilos na expectoração também se relaciona com valores reduzidos de FEV₁, mas parece não ter qualquer relação com PC20³⁹.

A presença de eosinofilia na expectoração induzida não se correlaciona necessariamente com os eosinófilos encontrados na biópsia da mucosa. O fenótipo eosinofílico identificado por biópsia brônquica pode correlacionar-se melhor com o valor da FENO. Os fenótipos definidos de acordo com a eosinofilia na expectoração induzida parecem correlacionar-se melhor com a gravidade da asma (mais eosinófilos associa-se a maior gravidade) do que os fenótipos definidos por biópsias brônquicas, admitindo-se que os eosinófilos presentes no lúmen possam reflectir estádios de maior activação, possivelmente associados a maiores quantidades de eotaxina e de CCL5⁴⁰.

Por outro lado, a expectoração induzida recolhe células provenientes de diferentes andares das vias aéreas, incluindo as vias periféricas e os alvéolos, enquanto as biópsias se restringem aos brônquios principais. A identificação de eosinofilia na expectoração será um parâmetro válido, por exemplo, para prever a resposta à corticoterapia. O tratamento da asma baseado nesta informação previne, pelo menos parcialmente, a ocorrência de exacerbações.

Observa-se uma boa correlação entre as contagens de eosinófilos na expectoração e no LBA.

A expectoração induzida também tem sido utilizada para análise de marcadores mais específicos directamente relacionados com o conhecimento de mecanismos fisiopatológicos de doença, como por exemplo mediadores do *stress* oxidativo envolvidos na asma.

Foram observados valores elevados de glutathione (GSH) e de nitritos (NO₂) na asma persistente moderada e em exacerbações, sendo, por isso, marcadores susceptíveis de virem a ser considerados na avaliação da extensão do processo oxidativo que se associa à inflamação crónica da asma⁴¹.

Apesar da informação susceptível de ser recolhida por esta técnica, ela é morosa, pode provocar broncoespasmo e exige disponibilidade imediata de técnicos de laboratório para a sua execução. Terá pois interesse em casos particulares.

Métodos indirectos

Gases no ar expirado: eNO

As vias respiratórias comunicam ciclicamente com o exterior através do fluxo aéreo. Em cada ciclo respiratório, o ar circulante contacta com as células alveolares e com todo o epitélio de revestimento brônquico e nasal. Nesse trajecto é enriquecido de dióxido de carbono e de compostos voláteis produzidos no decurso da respiração celular. A determinação desses compostos também dá informação sobre a inflamação das vias aéreas.

A FENO é o biomarcador mais extensamente estudado e níveis elevados de FENO estão bem documentados na asma não controlada.

O óxido nítrico (*nitric oxide* – NO) é produzido endogenamente em vários tipos celulares presentes no aparelho respiratório humano, nomeadamente na célula epitelial, no endotélio vascular e em células inflamatórias, como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, por acção da NO sintetase. A transcrição da *inductible nitric oxide sintetase* (iNOS), que tem maior repercussão nos níveis de NO

produzido, é regulada por citocinas pró-inflamatórias das células epiteliais e macrófágicas. Apesar disso, há também contribuição das outras duas isoformas de *nitric oxide sintetase* (NOS) para os níveis de FENO. Na cavidade oral, o NO é também formado por redução bacteriana do nitrato salivar a nitrito e, posteriormente, a óxido nítrico.

O valor de FENO correlaciona-se primariamente com a inflamação eosinofílica nas asma moderadas e tem sido usado na monitorização da resposta ao tratamento. Esta correlação pode estar ausente em situações de asma grave, em que podem provavelmente estar implicados outros tipos celulares. Na asma moderada, o FENO correlaciona-se ainda com a eosinofilia na expectoração induzida e com a HRB em doentes não sujeitos a corticoterapia, tal como com alterações na TC e na biópsia brônquica, mas não com parâmetros de função ventilatória basal^{40,42,43}.

Adolescentes com asma atópica em fase de remissão da doença mostraram valores elevados de FENO, eosinofilia no sangue, HRB à adenosina 5'-monofosfato (5' AMP) que se correlacionava positivamente com a eosinofilia em biópsias brônquicas sugerindo uma continuação do processo inflamatório e provavelmente de remodelação. A determinação de FENO pode ser importante na monitorização destas fases subclínicas, tendo em vista a necessidade de continuação de tratamento preventivo na evicção da progressão da doença. A sua medição longitudinal pode correlacionar-se não apenas com a eosinofilia na expectoração (e no sangue) e com a HRB, mas também com a clínica e com a função pulmonar basal. A vantagem dessa determinação repetida reside no facto das alterações de FENO precederem as que-

das dos débitos avaliadas por debitómetros, bem como o aparecimento de manifestações clínicas.

O FENO consiste num método simples de indicação do provável agravamento de inflamação eosinofílica e sobre a consequente necessidade de ajuste terapêutico direccionado, tendo por isso lugar na prática clínica regular⁴⁴. A instituição de terapêutica com corticosteróides, com antileucotrienos e com inibidores da NO sintetase reduzem o NO.

Existem variações importantes nos níveis de FENO, tanto em saudáveis como em doentes, que podem também ser atribuíveis à técnica utilizada. As concentrações do FENO originárias das vias aéreas revelam grande dependência do fluxo aéreo originário do compartimento brônquico e da cavidade nasal, estando demonstrado que fluxos demasiado rápidos limitam a transferência e registam valores inferiores. A paragem em apneia pode levar à retenção de NO e manobras de expiração prévia forçada à sua redução. A utilização recente de aparelhos mais rigorosos permite ultrapassar estas limitações. O tabagismo agudo ou crónico, assim como a ingestão de álcool, podem reduzir os valores de FENO.

Existem diversas condições que cursam com valores elevados de NO. Além da asma, observa-se um aumento de FENO na atopia, de uma forma independente da asma, no agravamento na DPOC, nas bronquiectasias, nas infecções respiratórias virais, no LES e na cirrose hepática. Pelo contrário, estes valores tendem a reduzir na SIDA.

As medidas de FENO na DPOC serão menos úteis, já que os valores encontrados serão normais ou apenas discretamente aumentados, excepto nas exacerbações. Recentemente, foi possível proceder-se à determinação

de FENO a diferentes fluxos aéreos através de *multiple exhalation flow technique* (MEFT), permitindo avaliar o NO provavelmente proveniente dos alvéolos e das pequenas vias aéreas. Foi possível observar que o aumento de NO proveniente de alvéolos e bronquíolos terminais se relacionava com a gravidade e não era afectado pelo tabaco nem por corticosteróides inalados, reflectindo a actividade da iNOS na periferia do pulmão em doentes com DPOC. O NO obtido por este método pode revelar-se um marcador inflamatório não invasivo importante na detecção precoce de desencadeantes, como infecções comuns que exacerbam a DPOC⁴⁵.

As determinações do NO também podem ser efectuadas no fluxo nasal. As concentrações nasais de NO são muito mais elevadas do que as do tracto respiratório inferior, em concordância com a sua maior produção a este nível. Foram observadas modificações importantes nas concentrações de NO no ar exalado nasal de doentes com rinite e com sinusite. O aumento de NO na rinite reflecte alguns aspectos da inflamação alérgica na mucosa nasal, mas também na mucosa sinusal, uma vez que parte do NO medido terá origem nos seios perinasais. Pelo contrário, na discinesia ciliar primária e na fibrose quística os valores podem estar muito reduzidos. Mesmo em períodos assintomáticos, os doentes com rinite têm valores mais elevados de NO nasal, valores que reduzem com a administração de corticoterapia inalada, podendo, também a este nível, avaliar a ocorrência de inflamação subclínica e monitorizar a resposta à terapêutica. Sabe-se, contudo, que mesmo efectuando uma correcta prevenção da contaminação pela boca, a influência que o contacto com os seios perinasais determina reduz a fidedignidade da

utilização desta técnica como rotina. De facto, existem variações na inflamação, assim como flutuações no grau de permeabilidade nasal susceptíveis de afectar de modo importante a difusão de NO a partir dos seios perinasais e, deste modo, comprometer a fiabilidade dos valores de NO como indicador da inflamação na rinite. Em concordância com esta discussão, refiram-se os reduzidos níveis de NO em doentes com extensa polipose nasal, que aumentam após a intervenção cirúrgica. Vários fármacos, como os descongestionantes nasais, vasodilatadores ou antibióticos, têm sido referidos como tendo capacidade para modificar os valores de NO nasal^{46,47,48}.

Gases no ar expirado: CO e VOC

O monóxido de carbono (CO) endogenamente produzido é também considerado um marcador da inflamação e do *stress* oxidativo utilizado no estudo das vias respiratórias. Estão descritos aumentos moderados dos valores de CO na asma, na DPOC e na fibrose quística. Os níveis elevados de CO ocorrem devido à expressão da hemoxygenase-1 (HO-1), enzima capaz de ser induzida por citocinas pró-inflamatórias. A simplicidade da análise permitiu o recurso a esta técnica na monitorização da inflamação em patologias como a asma, no reconhecimento de agudizações e na resposta à corticoterapia^{49,50}.

A sua aplicação mais alargada na clínica tem como grande limitação a falta de especificidade da técnica e a forte influência do tabagismo e de outros poluentes ambientais nos seus valores. Apesar de ainda não ter sido possível estabelecer relações claras entre o valor de CO exalado e a função ventilatória

(avaliada pelo FEV₁) ou a HRB, as modificações observadas em avaliação longitudinal correlacionam-se directamente com modificações nesta função. É por isso possível que determinações seriadas venham a constituir uma opção a considerar na monitorização do doente asmático^{51,52,53}.

O ar exalado contém milhares de outros compostos orgânicos voláteis (*volatile organic compounds* – VOC), como hidrocarbonetos, formaldeído, metanol, etanol, sulfito de hidrogénio, benzeno, propanol, acetona, tolueno, fenol e xileno, que podem servir como biomarcadores de doenças pulmonares. Têm sido encontradas associações entre valores de VOC exalados e doença pulmonar no homem, particularmente em relação ao cancro pulmonar. Não estão identificados compostos específicos de doença, mas existem variações que no seu conjunto são indicativas da presença de determinada patologia. A necessidade de ter disponível uma técnica que permita a separação e a identificação correcta de gases, como cromatografia, torna-a dispendiosa. A baixa especificidade da informação obtida constitui outra limitação do seu uso mais generalizado⁵⁴.

Condensado do ar expirado

O ar exalado contém mediadores voláteis, como NO, CO e compostos não voláteis, substâncias em fase líquida ou susceptíveis de condensar quando submetidas a baixas temperaturas. As concentrações destes mediadores são influenciadas por particularidades da doença, incluindo o fenótipo e a gravidade, e são susceptíveis de ser modulados por intervenção terapêutica.

A recolha de condensado do ar expirado (*exhaled breath condensate* – EBC) obtém-

-se por arrefecimento do ar exalado com auxílio de aparelhos capazes de proceder à condensação de alguns dos seus constituintes. Permite a identificação de numerosos elementos, nomeadamente peróxido de hidrogénio, óxidos de nitrogénio, isoprostanos, leucotrienos, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, produtos de peroxidação lipídica, adenosina, endotelina-1, proteínas totais, ureia, ECP, iões (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ,) pH, vitronectina, nitrosamina e adenosina.

Recentemente, foram descritos níveis elevados de 8-isoprostano $\text{F}_2\alpha$, um marcador do *stress* oxidativo no EBC em asmáticos. Crianças com níveis elevados deste marcador revelaram provas de provocação positivas ao exercício físico, em que a queda do FEV_1 se relacionou directamente com os valores de 8-isoprostano $\text{F}_2\alpha$ encontrados no início da prova⁵⁵.

O condensado do ar expirado de asmáticos pode conter níveis elevados de leucotrienos B_4 , C_4 , D_4 e E_4 . O tratamento com corticosteróides aparentemente reduz dum forma mais marcada os valores de LTE_4 , comparativamente com os outros leucotrienos, como o LTB_4 ⁵⁶. Os cisteinil leucotrienos estão também aumentados no EBC de asmáticos, independentemente do tratamento, constituindo um marcador de inflamação que permite distinguir crianças asmáticas de saudáveis como grupo, enquanto valores aumentados CCL_5 podem diferenciar formas de maior gravidade^{57,58}.

Os valores de malonildialdeído no condensado do ar exalado relacionavam-se directamente com marcadores de inflamação, como os valores de IL-8 no lavado nasal e com a exposição a poluentes ambientais e, inversamente, com a função pulmonar⁵⁹.

Os valores aumentados de endotelinas (ET-1) no condensado do ar expirado parecem correlacionar-se com valores de FENO e com eosinofilia periférica. A sua determinação reveste-se de particular importância pela sua actividade pró-inflamatória, pró-fibrótica e bronco e vasoconstritora determinante na patogenia da asma⁶⁰.

Altos níveis de nitritos/nitratos (NO^2/NO^3) têm sido encontrados no EBC de doentes asmáticos. Os valores de nitrotirosina estão associados a agravamento na asma moderada e deterioração da função pulmonar com a suspensão de corticoterapia inalada⁶¹. A adenosina modifica-se no mesmo sentido, reduzindo também com a corticoterapia inalada⁶². Os valores de pH no condensado do ar exalado estão reduzidos em asmáticos e com mais intensidade nos fumadores, embora possa haver sobreposição de valores entre doentes e controlos. Pequenas flutuações nos valores de pH não se relacionam com exacerbações⁶³. A temperatura do ar exalado também sofre um aumento em doentes asmáticos comparativamente com os controlos. Esse aumento correlaciona-se com o FENO e com os eosinófilos na expectoração induzida, traduzindo provavelmente um processo inflamatório em curso⁶⁴.

A determinação dos mediadores exalados é pois importante para atingir o controlo da inflamação na asma. Presentemente, usados apenas em investigação, têm potencial para vir a ser incluídos em rotina clínica. São inúmeras as variantes que podem ser avaliadas com recurso a esta metodologia^{65,66,67}.

Se a avaliação não invasiva da inflamação for, a curto prazo, mais fidedigna e reproduzível, tornar-se-á imprescindível, na prática clínica, para monitorização e controlo das doenças das vias aéreas.

Bibliografia

1. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Washington, DC: National Institutes of Health; National Heart, Lung and Blood Institute, 2003. Updated 2004. NIH publication No. 02-3659. Available at: <http://www.ginasthma.com> (accessed Jun 2005).
2. Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease Bethesda, MD: World Health Organization and US National Heart, Lung and Blood Institute, 2003.
3. Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. *Thorax* 2003; 58:528-532.
4. McCormack L, Enright. Making the Diagnosis of Asthma *Respiratory Care* 2008; 53: 583-590.
5. Ward C Inter-relationships between airway inflammation, reticular basement membrane thickening and bronchial hyper-reactivity to methacholine in asthma; asystematic bronchoalveolar lavage and airway biopsy analysis. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1565-1571.
6. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 551-559.
7. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, *et al.* Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 309-329.
8. Grootendorst DC, Rabe KF. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 77-87.
9. Porsbjerg C, Rasmussen L, Thomsen SF, Brannan JD, Anderson SD, Backer V. Response to mannitol in asymptomatic subjects with airway hyper-responsiveness to methacholine. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 22-28.
10. Sheahan P, Walsh RM, Walsh MA, Costello RW. Induction of nasal hyper-responsiveness by allergen challenge in allergic rhinitis: the role of afferent and efferent nerves. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 45-51.
11. Ketai L, Harkins M, Fiato KL, Iwamoto GK. Exhaled nitric oxide and bronchial wall thickening in asthmatics during and after acute exacerbation: evidence of bronchial wall remodeling. *J Asthma* 2005; 42: 667-671.
12. Marchac V, Emond S, Mamou-Mani T, Le Bihan-Benjamin C, Le Bourgeois M, De Blic J. Thoracic CT in pediatric patients with difficult-to-treat asthma. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 1245-1252.
13. Ketai L, Coutsiat C, Williamson S, Coutsiat V. Thin-section CT evidence of bronchial thickening in children with stable asthma: bronchoconstriction or airway remodeling? *Acad Radiol* 2001; 8: 257-264.
14. Jain N, Covar RA, Gleason MC, Newell JD Jr, Gelfand EW, Spahn JD. Quantitative computed tomography detects peripheral airway disease in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol* 2005; 40: 211-218.
15. Ueda T, Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Hirai T, Yamaguchi M. Role of small airways in asthma: investigation using high-resolution computed tomography. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1019-1025.
16. de Blic J, Scheinmann P. The use of imaging techniques for assessing severe childhood asthma *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 808-810.
17. Samee S, Altes T, Powers P, de Lange EE, Knight-Scott J, Rakes G. Imaging the lungs in asthmatic patients by using hyperpolarized helium-3 magnetic resonance: assessment of response to methacholine and exercise challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1205-1211.
18. Dourado M. Fisiopatologia laboratorial. *In: Mota Pinto, A. Fisiopatologia – Fundamentos e aplicações.* Lidel Edições técnicas 2007: 23-28.
19. Fujita M, Ueki S, Ito W, Chiba T, Takeda M, Saito N, Kayaba H. C-Reactive protein levels in the serum of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 99: 48-53.
20. Todo-Bom A, Mota Pinto A, Vale Pereira S, Alves V, Dourado M, Santos Rosa M, *et al.* Substance P in long-lasting asthma: Immunoinflammatory pathways. *Allergy Clin Immunol Int – J World Allergy Org* 2006; 18: 242-248.
21. Black PH. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun* 2002; 16: 622-653.
22. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, *et al.* Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 975-981.
23. Suzuki T, Chow CW, Downey GP. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1348-1361.
24. Laitinen LA, Laitinen A, Altraja A, Virtanen I, Kämpe M, Simonsson BG, Karlsson SE, Håkansson L, Venge P, Sillastu H. Bronchial biopsy findings in inter-

- mittent or "early" asthma *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 533-540.
25. Siddiqui S, Mistry V, Doe C, Roach K, Morgan A, Wardlaw A, Pavord I, Bradding P, Brightling C. Airway hyperresponsiveness is dissociated from airway wall structural remodelling *J Allergy Clin Immunol* 2008;122: 335-341.
26. Sutherland E, Martin R. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: Comparisons with asthma *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:819-827.
27. Jeffery PK, Haahtela T. Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one-airway condition *BMC Pulm Med* 2006; 30 (Supl 1):S5.
28. Barczyk A, Pierzcha W, Kon O, Cosio B, Adcock I, Barnes P. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1484-1492.
29. Francis JN, Sabroe I, Lloyd CM, Durham SR, Till SJ. Elevated CCR6+ CD4+ T lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response *Clin Exp Immunol* 2008; 152: 440-447.
30. Ciprandi G, Cirillo I, Klersy C, Tosca M, Marseglia G. Nasal eosinophils and reversibility to the decongestion test in patients with perennial allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28: 292-295.
31. Salib R., Lau L, Howarth P. The novel use of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 as an in vitro model to study the influence of allergens and cytokines on transforming growth factor- β gene expression and protein release. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 811-819.
32. Powel D, Huskisson R, Carney A, Jenkins D, McEuen A, Walls A, Jones N. Mucosal T-cell phenotypes in persistent atopic and nonatopic rhinitis show an association with mast cells *Allergy* 2004; 59: 204-212.
33. Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Volkmann B, Hagenberg A, Geldmacher H, Braun A, Krug N. Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1319-1327.
34. Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, Torrego A, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax* 2008; 63: 784-790.
35. Johansson MW, Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN, Mosher DF. Up-regulation and activation of eosinophil integrins in blood and airway after segmental lung antigen challenge. *J Immunol* 2008; 180: 7622-7635.
36. Borish L. Allergic rhinitis: Systemic inflammation and implications for management. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 1021-1031.
37. Braunstahl G, Overbeek S, Kleinjan A, Prins J, Hoogsteden H, Fokkens W. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 469-476.
38. Miadonna A, Milazzo N, Lorini M, Sala A, Tedeschi A. Nasal neutrophilia and release of myeloperoxidase induced by nasal challenge with platelet activating factor: different degrees of responsiveness in atopic and nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 947-954.
39. Woodruff, P. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 200;108: 753-758.
40. Catherine L. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: Eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:1033-1039.
41. Deveci F, Ilhan N, Turgut T, Akpolat N, Kirkil G, Muz MH. Glutathione and nitrite in induced sputum from patients with stable and acute asthma compared with controls. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93:91-97.
42. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholineresponsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53: 91-95.
43. Dupont LJ, Rochette F, Demedts MG, Verleden GM. Exhaled nitricoxide correlates with airway hyperresponsiveness in steroid-naïve patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157: 894-898.
44. Taylor D, Nitric oxide as a clinical guide for asthma management. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117: 259-262.
45. Sergei A, Kharitonov, Barnes PJ. FCCP exhaled biomarkers. *Chest* 2006; 130: 1541-1546.
46. Profita M, La Grutta S, Carpagnano E, Riccobono L, Di Giorgi R, Bonanno A, Pace E, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola A, Gjomarkaj M. Noninvasive methods for the detection of upper and lower airway inflammation in atopic children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1068-1074.
47. Travers J, Marsh S, Aldington S, Williams M, Shirtcliffe P, Pritchard A, Weatherall M, Beasley R. Reference ranges for exhaled nitric oxide derived from a random community survey of adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176: 238-242.

48. Boot JD, de Kam ML, Mascelli MA, Miller B, van Wijck RG, de Groot H, Cohen AF, Diamant Z. Nasal nitric oxide: longitudinal reproducibility and the effects of a nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Allergy* 2007; 62: 378-384.
49. Donnelly LE, Barnes PJ. Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 295.
50. Zayasu K, Sekizawa K, Okinaga S, *et al.* Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1140.
51. Uasuf CG, Jatakanon A, James A, *et al.* Exhaled carbon monoxide in childhood asthma. *J Pediatr* 1999; 135: 569.
52. Pearson P, Lewis S, Britton J, Fogarty A. Exhaled carbon monoxide levels in atopic asthma: a longitudinal study. *Respir Med* 2005; 99: 1292-1296.
53. Ramírez-Prieto MT, García-Río F, Villamor J. Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring *Med Clin* 2006; 127: 386-396.
54. Dragonieri S. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 856-862.
55. Barreto M, Pia Villa M, Olita C, Martella S, Ciabattini G, Montuschi P. 8-Isoprostane in exhaled breath condensate (EBC) and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children and adolescents. *Chest* 2008; 27. [Epub ahead of print]
56. Steiss JO, Rudloff S, Landmann E, Rückes-Nilges C, Zimmer KP, Lindemann H. Effect of inhaled corticosteroid treatment on exhaled breath condensate leukotriene E(4) in children with mild asthma. *Allergy Asthma Proc* 2008; 29: 371-375.
57. Kielbasa B, Moeller A, Sanak M, Hamacher J, Hutterli M, Cmiel A, Szczeklik A, Wildhaber JH. Eicosanoids in exhaled breath condensates in the assessment of childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 660-669.
58. Zietkowski Z, Tomasiak MM, Skiepkó R, Bodzenta-Lukaszyk A. RANTES in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients. *Respir Med* 2008; 102: 1198-1202.
59. Coop C, Hagan LL, Dice JP. Exhaled breath condensate pH in the evaluation of asthma. *Allergy Asthma Proc* 2008; 29: 51-54.
60. Accordino R, Visentin A, Bordin A, Ferrazzoni S, Marian E, Rizzato F, Canova C, Venturini R, Maestrelli P. Long-term repeatability of exhaled breath condensate pH in asthma. *Respir Med* 2008; 102: 377-381.
61. Romieu I, Barraza-Villarreal A, Escamilla-Núñez C, Almstrand AC, Diaz-Sanchez D, Sly PD, Olin AC. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 903-909.
62. Zietkowski Z, Skiepkó R, Tomasiak MM, Bodzenta-Lukaszyk A. Endothelin-1 in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients. *Respir Med* 2008; 102: 470-474.
63. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loudikes S: pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1364-1370.
64. Piacentini GL, Peroni D, Crestani E, Zardini F, Bodini A, Costella S, Boner A. Exhaled air temperature in asthma: methods and relationship with markers of disease. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 415-419.
65. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, *et al.* Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523-548.
66. Montuschi P. Indirect monitoring of lung inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 238-242.
67. Kostikas K, Koutsokera A, Papisiris S, Gourgoulis KI, Loukides S. Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 557-565.