

Uso do escarro induzido na avaliação da inflamação de vias aéreas em pacientes com asma

The use of induced sputum to evaluate inflammation of the airways in patients with asthma

ANNA C. DREWS¹
DANIELE C. ESCOUTO²
RENATO T. STEIN³

RESUMO

Objetivos: Descrever a utilidade e a segurança do escarro induzido, discutindo as vantagens e a importância desta técnica na pesquisa clínica em asma.

Fonte de dados: Banco de dados Pubmed (1985 a 2005).

Síntese dos dados: A identificação do padrão inflamatório da mucosa brônquica por meio do escarro induzido tem ajudado desde a última década no diagnóstico e no melhor entendimento da asma. É um método não invasivo, acurado e seguro, inclusive em crianças. O sucesso do exame depende do treinamento da equipe e de adequada validação do método. A monitoração da concentração de eosinófilos no escarro ajuda a prever resposta à corticoterapia e auxilia na retirada do mesmo, além de contribuir no diagnóstico de asma ocupacional. Fenótipos de asma não eosinofílica podem ser também identificados. Estudos epidemiológicos que utilizem a indução de escarro podem no futuro encontrar relações entre fatores de risco distintos e características inflamatórias.

Conclusões: O escarro induzido viabiliza a análise das características inflamatórias da via aérea inferior de forma não invasiva, sendo utilizado amplamente

ABSTRACT

Aims: To describe the utility and safety of induced sputum, discussing the advantages and importance of this technique on asthma clinical research.

Source of data: Pubmed data base (from 1985 to 2005).

Summary of the finding: The identification of bronchial mucosa inflammatory pattern by induced sputum analysis has been helpful since the last decade on the diagnosis and better comprehension of asthma. It is an accurate, safe and non-invasive technique, even in children. The success of the test depends on staff qualification and adequate method validation. The control of sputum eosinophil counts helps to predict corticosteroid response and withdraw. It also contributes to the diagnosis of occupational asthma. Non-eosinophilic asthma phenotypes were also identified. Epidemiologic studies using induced sputum might, in the future, find a relation between distinct risk factors and inflammatory features.

Conclusions: Induced sputum allows the analysis of lower airways inflammatory features in a non-invasive procedure that has been widely used over the last decade. It has been proved a safe, accurate and viable method, even in children. Studies analyzing the association between asthma

¹ Pediatra, especialização em Pneumologia Pediátrica pelo Hospital São Lucas da PUCRS. Mestranda em Pediatria e Ciências da Saúde, Hospital São Lucas da PUCRS.

² Acadêmica da Faculdade de Medicina da PUCRS. Bolsista do CNPq.

³ Pneumologista Pediátrico. Doutor em Pediatria pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Chefe do Departamento de Pneumologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS. Professor da Faculdade de Medicina da PUCRS

desde a última década. Mostrou-se um método seguro, acurado e viável, mesmo na população pediátrica. Estudos que associem dados epidemiológicos de asma com as manifestações inflamatórias da mucosa brônquica podem resultar num melhor entendimento da doença.

DESCRITORES: ESCARRO; INFLAMAÇÃO; ASMA.

epidemiology and bronchial inflammatory features may lead to a better understanding of the disease.

KEY WORDS: SPUTUM; INFLAMMATION; ASTHMA.

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença multifatorial, influenciada por características genéticas, ambientais, socioeconômicas e culturais. A ação conjunta de todos estes fatores contribuiu para um aumento na prevalência dessa doença e para o surgimento de diferentes fenótipos de asma, com manifestações clínicas variadas.¹ Três fenótipos bem documentados consistem na sibilância transitória, na sibilância não-atópica da criança e de pré-escolares e na sibilância atópica mediada por IgE.²

Independente da gravidade da doença e de seu fenótipo, a asma é caracterizada por uma inflamação crônica da mucosa brônquica, acompanhada por uma obstrução variável ao fluxo aéreo. Esta inflamação está presente em todos os tipos da doença, inclusive nos quadros mais leves, envolvendo diferentes células e mediadores.³ Com isto, tornou-se necessária uma melhor avaliação das características inflamatórias locais na via aérea.

Inicialmente, a coleta de células da mucosa brônquica para a avaliação de atividade inflamatória era feita por biópsia pulmonar, método invasivo e de riscos, já que consiste em procedimento cirúrgico. A broncoscopia com lavado broncoalveolar (LBA) surgiu como alternativa menos invasiva, mas foi apenas na última década que o estudo do processo inflamatório das vias aéreas inferiores se tornou viável através de um exame não invasivo.⁴ A indução de escarro por meio de nebulizações com solução salina hipertônica se mostrou método não invasivo, acurado, seguro, de baixo custo, sendo desde o início da década de 90 amplamente utilizado em pesquisas clínicas.^{4,5}

O presente artigo tem como objetivo descrever a utilidade e a segurança do escarro induzido (EI), discutindo as vantagens e a importância desta técnica na pesquisa clínica em asma.

MÉTODOS

Identificação dos estudos

O banco de dados Pubmed (de 1985 a 2005) foi utilizado para identificar os estudos. As palavras chaves utilizadas foram escarro induzido (*induced sputum*), asma (*asthma*), solução salina hipertônica (*hypertonic saline solution*) e inflamação de via aérea (*airway inflammation*). As referências bibliográficas dos artigos selecionados também foram verificadas para identificar estudos adicionais.

Seleção dos estudos

Inicialmente foram examinados o título e resumo de cada artigo identificado no banco de dados eletrônico. Os estudos considerados potencialmente relevantes foram submetidos a uma leitura detalhada do texto completo, sendo selecionados no caso de demonstrarem resultados relevantes e devidamente analisados. Foram incluídos estudos de revisão, estudos de caso-controle e estudos que tiveram como objetivo descrever a segurança e viabilidade da técnica do escarro induzido. As referências citadas nos estudos selecionados foram também avaliadas por este método.

SÍNTESE DOS DADOS

A carência de um exame não invasivo para a coleta de material da mucosa brônquica foi suprida na última década, quando o método da indução de escarro por meio de nebulizações com solução salina hipertônica foi finalmente padronizado.^{4,5} A partir deste momento, vários estudos têm sido publicados demonstrando a validade do método, sua acurácia, eficácia e segurança, inclusive em crianças.⁵⁻⁹

A indução do escarro era inicialmente realizada com nebulizadores de baixo fluxo e nebu-

lizadores a jato. A taxa de sucesso era de 76%.⁵ O aperfeiçoamento da técnica com o uso de nebulizadores ultrassônicos de alto fluxo contribuiu para um aumento na taxa de sucesso da indução,^{5,10,11} chegando a índices de 92%.¹¹ Além do tipo de nebulizador utilizado, é importante que as concentrações de solução salina sejam utilizadas de acordo com protocolos validados. As concentrações podem variar de 3 a 5%, utilizando-se concentrações crescentes (iniciando em 3%, sendo aumentado progressivamente até 5%),^{4,10,12} ou pode ser utilizada uma mesma concentração durante todo o período de indução.^{11,13}

Recomenda-se a utilização de solução salina a 4,5% por ser efetiva, geralmente bem tolerada e disponível comercialmente.¹³ Induções com uma mesma concentração de solução salina são tão eficientes quanto induções com aumento progressivo das concentrações da solução (3-5%).¹⁰ Nebulizações com solução salina isotônica (0,9%) também podem ser utilizadas, especialmente em pacientes que estejam em exacerbação de asma ou naqueles com asma grave e que possam não tolerar nebulizações com soluções hipertônicas.¹⁴ Não foi observada diferença na composição celular das amostras de escarro obtidas com solução salina isotônica ou hipertônica. Entretanto, a taxa de sucesso da indução é superior quando se utilizam soluções hipertônicas.¹⁰

Além do tipo de nebulizador e da concentração de solução salina utilizados, há diferentes métodos para a indução de escarro descritos na literatura, podendo a indução ser realizada isoladamente ou associada à técnica de broncoprovocação com solução salina hipertônica.¹¹

Indução de escarro (técnica isolada)

Na técnica isolada da indução de escarro administra-se 200 a 400 mcg de salbutamol spray antes do início da indução. O uso de salbutamol é útil na prevenção de broncoconstrição naqueles pacientes com hiperresponsividade brônquica à solução salina hipertônica, o que faz deste método o mais utilizado e recomendado na literatura.^{4,8,11,13} Podem ser utilizadas diferentes concentrações de solução salina (0,9 a 5%), com duração de cada nebulização (de 30 segundos a dez minutos) e tempo total de nebulizações (idealmente de 15 a 20 minutos) também variáveis.^{4,5,13} Quanto maior o tempo da indução, maior a chance de serem obtidas amostras de vias aéreas mais inferiores.¹³

Espirometrias são realizadas no início do exame (antes e após a administração do broncodilatador) e imediatamente após cada nebulização. O volume expiratório forçado em um segundo (VEF₁) é anotado e quedas do VEF₁ iguais ou superiores a 20% do valor obtido após a administração de broncodilatador são considerados critério para suspensão da indução. O exame é também encerrado se uma amostra adequada de escarro tiver sido obtida ou se o paciente apresentar piora clínica.^{4,5,13}

Indução de escarro concomitante à técnica de broncoprovocação com solução salina hipertônica

Este método tem a vantagem de possibilitar a avaliação da inflamação e da hiperresponsividade de vias aéreas em um mesmo exame, de forma simultânea. Nesta técnica não é administrado broncodilatador antes do início do exame, sendo o mesmo utilizado apenas no caso de piora clínica ou da função pulmonar.¹¹

Comparação entre indução de escarro (técnica isolada) e indução concomitante à técnica de broncoprovocação com solução salina hipertônica

Jones e colaboradores publicaram estudo comparando estas duas técnicas, utilizando a solução salina 4,5%.¹¹ A indução com inalação prévia de broncodilatador (técnica isolada) foi realizada por um tempo total de no máximo onze minutos de nebulizações com solução salina hipertônica (períodos de 1 minuto, dois minutos e dois períodos de 4 minutos). A broncoprovocação com solução salina hipertônica foi realizada por um período de no máximo 15,5 minutos. Foram incluídas neste estudo 235 crianças com asma (53 foram submetidas à indução com inalação prévia de broncodilatador e 182 foram submetidas à técnica associada à broncoprovocação). A taxa de sucesso da indução, com obtenção de uma amostra adequada de escarro, foi de 92% (49/53) no grupo com inalação prévia de broncodilatador e de 70% (127/182) no grupo submetido à técnica associada à broncoprovocação ($p = 0,03$). A indução do escarro foi melhor tolerada na técnica com inalação prévia de broncodilatador. O efeito colateral mais comumente observado foi tosse. Apenas 4% dos pacientes (2/53) submetidos à técnica com inalação prévia de broncodilatador apresentaram tosse. Já

na técnica concomitante à broncoprovocação, a tosse foi observada em 13% (23/182) dos pacientes ($p = 0,0005$). Ao analisar o escarro coletado, não houve diferença entre os dois grupos na contagem total de células, na percentagem de neutrófilos e de linfócitos, na dosagem de proteína catiônica eosinofílica e nem de interleucina (IL)-8. Houve diferença significativa na viabilidade celular, na percentagem de macrófagos, de eosinófilos e de células epiteliais e no tempo de nebulização. O tempo de nebulização foi superior na técnica associada à broncoprovocação.¹¹

A variação no tempo de nebulização pode alterar a contagem diferencial de células (percentagem de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e macrófagos).¹³ Nebulizações realizadas por períodos mais longos fornecem amostras de escarro de vias aéreas mais inferiores, resultando em menos neutrófilos e eosinófilos e mais macrófagos. Nebulizações por períodos mais curtos viabilizam escarro de vias aéreas mais proximais, sendo o diferencial de células mais rico em neutrófilos e eosinófilos, com menos macrófagos alveolares.^{5,15} Isto pode explicar a diferença na contagem de células encontrada no estudo de Jones e colaboradores. Nos pacientes submetidos à técnica com inalação prévia de broncodilatador, observou-se menor tempo de nebulização, maior percentagem de eosinófilos e menor percentagem de macrófagos.¹¹

Para assegurar coleta de material de vias aéreas mais distais e evitar diferenças entre as amostras coletadas, recomenda-se o uso de tempos constantes e mais prolongados de nebulizações durante a indução de escarro. Atualmente, sugere-se um tempo de nebulização de pelo menos 15 minutos, podendo as nebulizações serem realizadas por mais 5 minutos se uma amostra adequada de escarro não tiver sido obtida.^{5,13} O período total de nebulizações deve ser sempre citado, a fim de possibilitar adequada comparação entre os resultados dos diferentes estudos publicados.¹³

Efeitos colaterais da indução de escarro

A indução de escarro com solução salina hipertônica (com ou sem inalação prévia de broncodilatador) consiste em método seguro e bem tolerado pelos pacientes, mas alguns efeitos colaterais podem ocorrer. Os eventos mais comuns consistem em: salivação, boca salgada, náuseas, tosse, dispnéia e broncoconstricção. A salivação, a boca salgada e as náuseas podem ser

evitadas ou amenizadas se o paciente lavar a boca com água antes do início e entre o intervalo de cada nebulização. Os sintomas respiratórios (tosse, dispnéia, broncoconstricção) podem ser prevenidos com inalação de broncodilatador antes do início do exame.¹³

Nos pacientes que apresentarem função pulmonar reduzida antes do início da indução de escarro, a mesma pode ser realizada com solução salina isotônica e inalação prévia de 200 a 400 mcg de salbutamol spray, diminuindo-se assim a chance de piora da função pulmonar.^{5,14}

Qualidade da amostra de escarro

Independente de qual método for escolhido, o objetivo principal é obter uma amostra adequada de escarro. O escarro é composto por líquidos e componentes celulares como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, células da mucosa brônquica e células inflamatórias. Quando expectorado, há mistura do escarro com saliva, células epiteliais escamosas e bactérias da orofaringe.¹⁶ A contaminação por saliva, rica em células escamosas, é um problema comum. As células escamosas são células grandes que, em concentrações elevadas, dificultam a visualização de outras células (eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, etc.).^{5,16}

A contaminação da amostra por saliva e por secreções das vias aéreas superiores pode ser minimizada se o paciente lavar a boca com água antes de iniciar o exame e durante o intervalo das nebulizações e se assoar o nariz antes do início da indução.^{5,16} Solicitar ao paciente para depositar a saliva acumulada na boca em um frasco diferente do destinado ao escarro, também pode diminuir a contaminação por células escamosas.¹³

Após processada, a amostra é considerada adequada se houver:

- Pouca contaminação por saliva (< 20% de células escamosas).^{4,10,16,17}
- Viabilidade celular superior a 50%, visualizada em uma câmara de Neubauer (hemocítômetro), sendo as lâminas coradas com azul de Tripán. As células coradas em azul são as células mortas.^{4,16,17}
- Escore de qualidade celular superior a 4: são avaliadas a quantidade de debris celulares (nenhum = 3, moderada = 2, excessiva = 1), as bordas celulares (preservadas = 3, dano celular isolado = 2, muitas células danificadas = 1) e a impressão geral do observador (boa = 3, aceitável = 2,

ruim = 1). Este escore tem uma pontuação mínima de 3 e máxima de 9.¹⁶

- Possibilidade de analisar pelo menos 400 células.^{4,13,16}

Processamento e análise do escarro induzido

Um adequado processamento e análise da amostra devem ser realizados. Isto requer uma equipe de profissionais responsáveis, experientes e com treinamento adequado, utilizando técnicas pré-validadas.^{13,18} Há duas técnicas validadas bastante utilizadas atualmente: uma seleciona (com o auxílio de um microscópio) os "plugs" de secreção da amostra, tentando assim diminuir a quantidade de saliva. O material selecionado é então processado. A outra técnica processa todo o material coletado, sem separação da saliva. A vantagem de selecionar o escarro antes do processamento da amostra é a possibilidade de diminuir a contaminação da amostra por saliva, sendo conseqüentemente menor a percentagem de células escamosas nas lâminas processadas, facilitando a visualização das outras células. A desvantagem deste método é a necessidade de um microscópio invertido (nem sempre disponível nos laboratórios) e a maior demora no processamento da amostra.^{5,18}

O material pode ser processado em até 9 horas após a coleta se armazenado a -4 °C,¹⁷ mas recomenda-se o processamento da amostra em até 2 horas.^{4,17,19}

Após processada, a amostra pode ser analisada quanto a características celulares (contagem total de células, percentagem de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos e células escamosas) e bioquímicas.^{18,19}

Independente de qual componente do escarro induzido for analisado, esta análise deve ser sempre validada. Até o momento, a análise do escarro induzido foi validada principalmente quanto à concentração de eosinófilos, expressa em percentagem de eosinófilos sobre a quantidade total de células não escamosas observadas na amostra.¹⁹

Utilidade do escarro induzido na prática clínica

A identificação do padrão inflamatório da mucosa brônquica tem ajudado no diagnóstico e no melhor entendimento da asma e também na decisão de condutas terapêuticas. Já se sabe que

na "asma clássica" (associada à alergia) há aumento da concentração de eosinófilos na mucosa brônquica²⁰ e que a terapia com corticóides pode ajudar a diminuir essa concentração.²¹ A monitoração da concentração de eosinófilos no EI pode ser útil para prever resposta ao tratamento com corticóides e também para auxiliar na suspensão do mesmo.²² Pacientes com concentrações de eosinófilos inferiores a 3% apresentam pobre resposta à corticoterapia.²³ Alterações nas concentrações de eosinófilos no EI podem também ajudar no diagnóstico de pacientes com asma ocupacional.²⁴ Foi descrito ainda que pacientes em exacerbação de asma ou com asma grave apresentam um aumento da concentração de neutrófilos,^{17,25} e que pacientes com tosse crônica não relacionada à asma e sem inflamação eosinofílica não respondem ao tratamento inalatório com budesonida.²⁶

Outra colaboração da avaliação da resposta inflamatória brônquica é a identificação de novos fenótipos de asma sem associação com atopia, onde a inflamação eosinofílica nem sempre está presente. Em revisão realizada por Dowes e colaboradores, apenas 50% dos casos de asma apresentaram uma inflamação predominantemente eosinofílica. Nos demais casos, uma inflamação neutrofílica se mostrou presente, tanto em pacientes com asma grave como naqueles que apresentavam asma leve e moderada.²⁷

Uso do escarro induzido no estudo da asma

O grande número de estudos realizados na última década demonstra a importância do EI no estudo da asma. É consenso na literatura de que a asma é uma doença multifatorial, sendo sua fisiopatogenia influenciada por fatores genéticos, socioeconômicos e ambientais (como a exposição a alérgenos, infecções virais, bacterianas e parasitárias).^{1,28-30} A influência dos fatores ambientais e a identificação de fatores de risco para a doença têm sido amplamente estudados em grandes estudos epidemiológicos.¹ A avaliação de características inflamatórias por meio do EI pode ser incluída em estudos epidemiológicos e relações entre padrões inflamatórios e fatores de risco para asma podem ser encontrados. Outra vantagem do EI é a viabilidade de seu uso em crianças. O uso do EI contribuiu de forma significativa no estudo da inflamação de via aérea neste grupo de pacientes, onde a realização de broncoscopia com LBA muitas vezes não era possível

por implicações éticas. Gibson publicou em 1998 um estudo descrevendo o uso do EI em crianças com asma. O método é seguro e com taxas de sucesso semelhantes aos adultos, sendo viável em crianças a partir de 6 anos de idade.⁹

Para adequada utilização do EI na pesquisa clínica, Inman e colaboradores sugerem que cada grupo de pesquisa determine o tamanho de amostra baseado em dados de variabilidade e reprodutibilidade da concentração de eosinófilos no escarro de sua própria população.⁷ Portanto, deve-se inicialmente realizar estudos que descrevam as características citológicas do escarro induzido da população que se pretenda estudar. No Brasil, recentemente foi publicado um estudo realizado em São Paulo, o qual descreveu as características citológicas (percentagem de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos) em pacientes de 6 a 18 anos, estáveis ou em exacerbação de asma. O exame se mostrou seguro (inclusive no pacientes em exacerbação de asma), com taxa de sucesso de 67%. Os achados citológicos foram comparados entre quatro grupos (asma leve, moderada, grave e exacerbação de asma), não sendo encontrada diferença na quantificação de eosinófilos. Isto pode ser atribuído ao fato de, neste estudo, todos os pacientes estarem recebendo terapia com corticóide, o que diminui a concentração de eosinófilos na mucosa brônquica. Nos pacientes em exacerbação de asma houve predomínio de neutrófilos ($p < 0,005$).¹⁷

Como já discutido anteriormente, o uso do EI pode levar a um melhor entendimento da fisiopatogenia da asma. Entretanto, os estudos utilizando este método devem ser realizados apenas por equipes previamente treinadas e com experiência, assegurando-se assim resultados confiáveis.¹³

Perspectivas quanto ao uso do escarro induzido

O estudo das características inflamatórias locais de via aérea pode ajudar a entender de forma mais clara o que realmente ocorre na mucosa brônquica nos diferentes tipos de asma, permitindo, no futuro, estudar a associação entre fatores de risco para a doença e manifestações inflamatórias da mesma.

A existência de diferentes fenótipos de asma, alguns não associados à atopia² e o fato de fenótipos sem inflamação eosinofílica serem tão comuns quanto os com inflamação neutrofílica,²⁷

evidencia mais uma vez o caráter multifatorial da doença. O tratamento da asma é hoje basicamente realizado por meio de broncodilatores e terapia com corticóides.³ Sabe-se que os corticóides diminuem a concentração de eosinófilos na mucosa brônquica, mas parecem exercer pouco efeito em pacientes com concentrações inferiores a 3%.²³ Neste grupo de pacientes, talvez não seja adequado iniciar corticoterapia.

A utilização do EI em estudos epidemiológicos pode ajudar a identificar diferentes marcadores inflamatórios no escarro dos pacientes que têm remissão espontânea da asma e naqueles que permanecem com sintomas persistentes.⁵

Mais estudos são necessários para demonstrar o efeito dos corticóides e talvez de novas opções terapêuticas nos pacientes com asma.

CONCLUSÕES

O EI viabiliza a análise das características inflamatórias da via aérea inferior de forma não invasiva, sendo utilizado amplamente desde a última década. Mostrou-se um método seguro, acurado e viável, mesmo na população pediátrica. O sucesso do exame depende do treinamento adequado de toda a equipe, desde a indução do escarro até o processamento e a análise da amostra. A descrição da percentagem de eosinófilos e neutrófilos na mucosa brônquica possibilitou a identificação de fenótipos de asma não-eosinofílica, não associados à alergia. A monitorização da concentração de eosinófilos na mucosa brônquica por meio do EI pode ajudar a prever resposta ao tratamento com corticóides e também auxiliar no processo de redução e suspensão do mesmo. Estudos que associem dados epidemiológicos da asma com as manifestações inflamatórias da mucosa brônquica podem resultar num melhor entendimento da doença e talvez na identificação de novas opções terapêuticas específicas para cada tipo de paciente.

REFERÊNCIAS

1. Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J*. 1998;12:315-35.
2. Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2004;5:155-61.
3. Global Initiative of Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda (MD): National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health;2002. NIH publication 02-3659. Available at: <http://www.ginasthma.com>

4. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992; 47: 25-9.
5. Djukanovic R. Induced Sputum. Chestnet, PCCU, lesson 4, vol. 16. www.chestnet.org/education/online/pccu/vol16/lessons3-4/lesson04.php
6. Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, et al. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax*. 2000;55(9):768-74.
7. Inman MD, Jayaram L, Bel EH, et al. The use of induced sputum in clinical trials. *Eur Respir J*. 2002;20:47s-50s.
8. Wong HH, Fahy JV. Safety of one method of sputum induction in asthmatics subjects. *Respir Crit Care Med*. 1997;156:299-303.
9. Gibson PG. Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102:S100-01.
10. Popov TA, Pizzichini MMM, Pizzichini E, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J*. 1995;8;559-65.
11. Jones PD, Hankin R, Simpson J, et al. The tolerability, safety, and success of sputum induction and combined hypertonic saline challenge in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(7):1146-9.
12. Pizzichini MMM, Popov TA, Efthimiadis A, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:866-9.
13. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, et al. Sputum induction. *Eur Respir J*. 2002;20:3S-8S.
14. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland L, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma. Kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:1501-6.
15. Gershman NH, Liu H, Wong HH, et al. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different points. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:322-8.
16. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, et al. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*. 1996;9:1174-80.
17. Palomino ALM, Bussambra MHCF, Saraiva-Romanholo BM, et al. Escarro induzido em crianças e adolescentes com asma: segurança, aplicabilidade clínica e perfil de células inflamatórias em pacientes estáveis e durante exacerbação. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81(3):216-24.
18. Efthimiadis A, Spanevello A, Hammid Q, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Eur Respir J*. 2002;20(Suppl 37):S19-S23.
19. Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. *Eur Respir J*. 2000;16:355-9.
20. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax*. 2003;58(2):116-21.
21. Gibson PG, Saltos N, Fakes K. Acute anti-inflammatory effects of inhaled budesonid in asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163(1):32-6.
22. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, et al. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(10):1077-82.
23. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, et al. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*. 1999;353(9171):2213-4.
24. Lemiere C, Pizzichini MM, Balkisson R, et al. Diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Eur Respir J*. 1999;13(3):482-8.
25. Fahy JV, Kim KW, Liu J, et al. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95:843-52.
26. Pizzichini MM, Pizzichini E, Parameswaran K, et al. Nonasthmatic chronic cough: No effect of treatment with an inhaled corticosteroid in patients without sputum eosinophilia. *Can Respir J*. 1999;6(4):323-30.
27. Douwes J, Gibson PG, Pekkanen J, et al. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*. 2002;57:643-8.
28. Gibson PG, Henry RL, Shah S, Powell H, Wang H. Migration to a western country increases asthma symptoms but not eosinophilic airway inflammation. *Pediatr Pulmonol*. 2003;36(3):209-15.
29. Kurukulaaratchy RJ, Fenn M, Matthews S, Arshad SH. Characterization of atopic and non-atopic wheeze in 10 year old children. *Thorax*. 2004;59:563-68.
30. Céledon JC, Wright RJ, Litonjua AA, Sredl D, Ryan L, et al. Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1239-43.

Endereço para correspondência:

ANNA CLÁUDIA DREWS
Rua Guilherme Alves 469, ap. 307 - Jardim Botânico
CEP 90680-001, Porto Alegre, RS, Brasil
Fone: (51) 3330-6160 - Fax: 3384-5104
E-mail: annadrews@pneumoped.com.br