

Parâmetros associados a sibilância recorrente após bronquiolite aguda

Pedro José Flores Vieira e Silva

Julho, 2008

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Medicina, disciplina de Pediatria,
apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Prof Doutor João M Videira Amaral

Esta dissertação foi preparada de acordo com o Regulamento nº2/2004, que apresenta as normas para elaboração de provas de doutoramento na Universidade Nova de Lisboa, publicado no DR (IIª Série) nº5 de 7 de Janeiro de 2004

O autor declara não existirem conflitos de interesses na elaboração desta tese. Não recebeu qualquer contribuição monetária da indústria farmacêutica. Declara ter recebido, da Associação de Pediatras de S. Francisco Xavier, a quantia de 2500 euros destinada totalmente à compra de reagentes laboratoriais.

As opiniões expressas nesta dissertação são da exclusiva responsabilidade do seu autor.

ÍNDICE

Índice de figuras	v
Índice de quadros	vi
Principais abreviaturas	vii
Preâmbulo	viii
Agradecimentos	x
 Introdução	 1
Fundamentação teórica	3
Anatomia e histologia do aparelho respiratório do lactente	3
Desenvolvimento do aparelho respiratório	5
Estrutura	5
Função	6
Inflamação e imunidade	8
Linfócitos T – paradigma Th1 / Th2	9
Remodelação	10
Metodologias de estudo de inflamação e imunidade em doenças sibilantes	11
Citocinas	13
Interleucina 4	13
Interleucina 13	14
Interleucina 12	14
Interferão γ	14
Outros factores determinantes da estrutura e função bronquiolar	15
Genética	15
Fumo de tabaco	15
Bronquiolite aguda	17
Agentes etiológicos de bronquiolite aguda	19
Vírus sincicial respiratório	19
Vírus parainfluenza	21
Vírus influenza	22
Adenovírus	23
Metapneumovírus humano	24
Rinovírus	24
Mecanismos virais de evicção do sistema imune	24
Sibilância recorrente	26
Clínica e classificação	26
Exames complementares de diagnóstico	29
Terapêutica	30
Investigação realizada	32
Objectivos	32
Plano geral do estudo	33
Tipo de estudo	34
Material e Métodos	35
Doentes estudados	35
Critérios de exclusão	35
Questionários	36
Tratamento do episódio inicial	36
Definições	36
Variáveis estudadas	39
Variáveis clínicas	39
Variáveis laboratoriais	41
Procedimentos laboratoriais	42
Estudo virológico	42
Estudo das citocinas	42
Seguimento dos doentes	45
Aspectos éticos	47
Análise estatística	47

Resultados	48
Amostra estudada	48
Estatística descritiva	50
Variáveis clínicas	50
Variáveis laboratoriais	56
Variáveis provenientes do seguimento dos doentes	59
Análise univariada dos parâmetros estudados	60
Parâmetros associados à ocorrência de sibilância recorrente	61
Comportamento das citocinas associadas à via Th1 ou Th2	68
Resumo da análise univariada do comportamento das citocinas	77
Análise multivariada	79
Parâmetros com influência sobre sibilância vs não sibilância	80
Parâmetros com influência sobre o comportamento das citocinas	82
Resumo da análise multivariada do comportamento das citocinas	84
Discussão	87
Da importância e actualidade do tema	87
Das implicações clínicas	92
Das limitações do presente estudo	93
Da metodologia	95
Dos resultados	105
Da estatística descritiva	106
Dos modelos univariados	113
Dos factores associados à evolução para sibilância recorrente	113
Dos factores que influenciaram a expressão das citocinas nasais	123
Do modelo multivariado	132
Dos factores associados a sibilância recorrente	132
Dos factores que influenciaram a expressão das citocinas nasais	134
Conclusões	138
Recomendações e Sugestões	140
Resumos	142
Português	142
Inglês	143
Castelhano	144
Referências bibliográficas	145
Anexos	154

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Alguns mediadores participantes na inflamação brônquica	2
Figura 2: Anatomia do aparelho respiratório no lactente	3
Figura 3: Corte histológico, em microscopia óptica, de epitélio brônquico (HEx400)	4
Figura 4: Desenvolvimento do aparelho respiratório	5
Figura 5: Evolução cronológica dos diferentes tipos de doença sibilante da infância	7
Figura 6: Representação esquemática da síntese proteica	12
Figura 7: Esquema muito simplificado do paradigma celular Th1 e Th2	13
Figura 8: Cultura de células de epitélio nasal após infecção por VSR com formação de sincícios	19
Figura 9: Representação gráfica da estrutura de VSR	20
Figura 10: Representação esquemática da estrutura do VPI	21
Figura 11: Representação do Vírus Influenza	22
Figura 12: Representação esquemática do Adenovírus	23
Figura 13: Influência de diversos factores no aparecimento e na evolução de doenças sibilantes da infância	31
Figura 14: Exemplo de curva de amplificação de RT-PCR	44
Figura 15: Gráfico ARN vs ciclo de PCR: exemplo da análise da cinética da amplificação de 10 amostras	45
Figura 16: Fluxograma referente à exclusão dos doentes no decorrer do estudo	49
Figura 17: Distribuição em histograma dos doentes conforme as semanas do estudo	50
Figura 18: Distribuição em histograma dos doentes por idade	51
Figura 19: Histograma de distribuição do peso dos doentes na data do primeiro episódio de bronquiolite	54
Figura 20: Histograma do índice de gravidade da bronquiolite inicial	55
Figura 21: Distribuição do número de leucócitos (cels/ul) efectuada nos doentes internados	56
Figura 22: Distribuição do número de neutrófilos (cels/ul) efectuada nos doentes internados	56
Figura 23: Distribuição do número de linfócitos (cels/ul) efectuada nos doentes internados	57
Figura 24: Distribuição do número de eosinófilos (cels/ul) efectuada nos doentes internados	58
Figura 25: Distribuição gráfica da expressão dos genes das quatro citocinas estudadas	58
Figura 26: Representação, em fluxograma, do tipo de seguimento e classificação final dos doentes	59
Figura 27: Idade da primeira bronquiolite e sibilância recorrente	62
Figura 28: Tabaco no domicílio e sibilância recorrente	62
Figura 29: História materna de atopia e sibilância recorrente	63
Figura 30: Exposição antenatal a tabaco e sibilância recorrente	63
Figura 31: Peso inicial e sibilância recorrente	64
Figura 32: Presença de febre no episódio inicial e sibilância recorrente	64
Figura 33: Gravidade da primeira bronquiolite e sibilância recorrente	65
Figura 34: Necessidade de internamento no episódio inicial e sibilância recorrente	65
Figura 35: Pesquisa de vírus nas secreções nasais na primeira bronquiolite e sibilância recorrente	66
Figura 36: Estirpes virais identificadas na primeira bronquiolite e sibilância recorrente	66
Figura 37: Distribuição gráfica da expressão de IL-4 acima dos 6 meses de idade, e relação com evolução para sibilância recorrente	67
Figura 38: Expressão génica de IL-4 consoante houve ou não isolamento de vírus respiratório no primeiro episódio de bronquiolite	69
Figura 39: Diferentes expressões de IL-4 entre VSR 4 e VSR -	69
Figura 40: Ciclos de amplificação de IL-13, consoante a criança foi ou não amamentada	70
Figura 41: Gráfico de dispersão do número absoluto de linfócitos circulantes, em função da expressão de IL-13 na mucosa nasal	71
Figura 42: Gráfico de dispersão do número absoluto de eosinófilos circulantes, em função da expressão de IL-13 na mucosa nasal	71
Figura 43: Gráfico de dispersão da expressão de IL-12 na mucosa nasal, em relação com a escolaridade da mãe em anos	72
Figura 44: Diferença de expressão de IL-12 na mucosa nasal entre conviventes e não conviventes com fumo de tabaco	73
Figura 45: Diferença de expressão de IL-12 na mucosa nasal e frequência de infantário (acima dos 4 meses de idade)	73
Figura 46: Gráfico de dispersão dos valores totais de linfócitos no sangue periférico das crianças internadas, em função da expressão de IL-12 na mucosa nasal	74
Figura 47: Diferença de expressão de IFN- γ na mucosa nasal entre conviventes e não conviventes com fumo de tabaco	75
Figura 48: Diferença de expressão de IFN- γ na mucosa nasal consoante as crianças frequentavam ou não o infantário (após os 4 meses de idade).	76
Figura 49: Diferença de expressão de IFN- γ na mucosa nasal consoante as crianças conviviam ou não com outras crianças	76
Figura 50: Diferença de expressão de IFN- γ na mucosa nasal entre doentes com bronquiolite internados ou tratados em ambulatório	76
Figura 51: Representação gráfica, em escala logarítmica, dos <i>odds ratio</i> calculados para cada parâmetro, quanto à evolução para sibilância recorrente	81
Figura 52: Representação gráfica, em escala logarítmica, dos <i>odds ratio</i> dos diversos parâmetros com influência estatisticamente significativa sobre o predomínio da imunidade de tipo Th1	85
Figura 53: Representação gráfica da influência dos diversos parâmetros sobre a recorrência de sibilância após primeiro episódio de bronquiolite e, em paralelo, sobre o comportamento das citocinas à superfície da mucosa nasal	86

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Patologias associadas a sibilância recorrente ou persistente no lactente	27
Quadro 2: Classificação das síndromas sibilantes do lactente pela frequência e intensidade dos sintomas	28
Quadro 3: Classificação das síndromas sibilantes do lactente conforme o nível de controlo sintomatológico	28
Quadro 4: Exames complementares necessários na investigação da sibilância recorrente da infância	29
Quadro 5: Terapêutica de fundo na sibilância recorrente do lactente	30
Quadro 6: Índice de gravidade da bronquiolite aguda	40
Quadro 7: Definição de predomínio Th1 ou Th2 conforme a posição relativa de cada amostra em relação à média	41
Quadro 8: Critérios para o cálculo do IPA em crianças com 3 anos de idade e sibilância recorrente	46
Quadro 9: Distribuição em quadro dos doentes conforme as semanas do estudo	50
Quadro 10: Distribuição dos doentes por idade	51
Quadro 11: Distribuição da amostra, de acordo com o grau de escolaridade (em anos) dos pais	52
Quadro 12: Número de coabitantes de cada criança	52
Quadro 13: Índice de gravidade	55
Quadro 14: Distribuição dos valores de expressão genética dos genes das citocinas estudadas	58
Quadro 15: Análise univariada dos parâmetros associados a sibilância recorrente	61
Quadro 16: Análise univariada dos parâmetros com influência sobre a variação de IL-4	68
Quadro 17: Análise univariada dos parâmetros com influência sobre a variação de IL-13, com significado estatístico	70
Quadro 18: Análise univariada dos parâmetros associados à variação de IL-12	72
Quadro 19: Análise univariada dos parâmetros com influência sobre a variação de IFN- γ .	75
Quadro 20: Determinação do predomínio Th1 ou Th2 associado a cada um dos parâmetros avaliados	77
Quadro 21: Modelo multivariado dos parâmetros avaliados em relação a sibilância recorrente	81
Quadro 22: Modelo multivariado da influência dos diversos factores sobre a expressão de IL-4	82
Quadro 23: Modelo multivariado da influência dos diversos factores sobre a expressão de IL-13	82
Quadro 24: Modelo multivariado da influência dos diversos factores sobre a expressão de IL-12	83
Quadro 25: Modelo multivariado da influência dos diversos factores sobre a expressão de IFN- γ	83
Quadro 26: Resumo das diferentes variáveis com significado estatístico no modelo multivariado, conforme o sentido em que direccionam a sua acção (predomínio Th1 ou Th2)	84

PRINCIPAIS ABREVIATURAS

Ac: Anticorpo
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementar
Ag: Antígeno
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensageiro
cpm: Ciclos por minuto
CI: Corticosteróides inalatórios
dNTP: Desoxirribonucleótidos
ELISA: Imunoabsorção ligada a enzima
FEV₁: Fluxo expiratório máximo no primeiro segundo (FEV₁)
FCM/UNL: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
GINA: Global Initiative for Asthma
HSFX: Hospital de S. Francisco Xavier
IC_{95%}: Intervalo de confiança com probabilidade de 95%
IPA: Índice preditivo de asma
IFN- γ : Interferão gama
Ig: Imunoglobulina
IL-4: Interleucina 4
IL-12: Interleucina 12
IL-13: Interleucina 13
IPA: Índice Preditivo de Asma
NO: Monóxido de azoto
OR: odds ratio
PCR: Amplificação em cadeia de polimerase
RT-PCR: Amplificação em cadeia de polimerase após transcrição reversa
SpO₂: Saturação transcutânea da hemoglobina em oxigénio
Th1: T *helper* tipo 1
Th2: T *helper* tipo 2
VPI: Vírus Parainfluenza
VI: Vírus Influenza
VSR: Vírus Sincicial Respiratório

PREÂMBULO

No âmbito do exercício de medicina, tenho adoptado uma filosofia de vida profissional que tenta abranger as três vertentes desta actividade, que penso serem indissociáveis: a assistência, o ensino e a investigação.

Considero que a assistência aos doentes, centrada no alívio do seu sofrimento, constitui a finalidade primordial da medicina. Desde os primeiros anos de prática generalista à posterior especialização em pediatria e, dentro desta, à preferência pela pneumologia pediátrica, a minha actividade assistencial nunca foi interrompida. Em contexto público ou privado, através da prestação de cuidados aos doentes internados ou em ambulatório, tenho vindo a acumular, ao longo dos anos, experiência clínica e de serviço à comunidade.

O ensino é, da mesma forma, uma actividade importante. Uma parcela significativa da ciência médica provém de conhecimentos empíricos, oriundos da prática clínica diária e do convívio com os colegas. Quem recebe esses conhecimentos tem o dever ético de os transmitir aos seus pares. O meu envolvimento no ensino / aprendizagem de pediatria tem ocorrido, fundamentalmente, na actividade de assistente convidado da disciplina de pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCM / UNL). Em 2001 fui convidado, pelo Prof Doutor JM Martins Palminha, para desempenhar essa função, tendo-a mantido até ao presente, a convite dos outros regentes das áreas de pediatria (primeiro o Prof Doutor João M Videira Amaral e, após a sua jubilação como catedrático, a Prof Doutora Teresa Neto). O estímulo intelectual que me é proporcionado pelo convívio quotidiano com alunos e estagiários tem-me levado a pôr em causa as minhas certezas e a melhorar continuamente, como clínico e docente.

A investigação, que pressupõe a actualização incessante e a participação em estudos científicos, é também uma obrigação do médico. A prática profissional está em constante evolução, beneficiando do contributo das diversas ciências básicas e da investigação clínica. Ao longo dos anos tenho desenvolvido projectos de investigação, em colaboração com outras instituições como, por exemplo, o Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge. Tenho igualmente participado em estudos de revisão casuística e na reflexão sistematizada em torno de casos clínicos com interesse pedagógico ou científico. Valorizo essas actividades pela necessidade de rigor e método inerente à sua realização, e pela inevitável melhoria que acrescentam à qualidade dos cuidados de saúde.

A investigação que apresento nesta dissertação resultou, assim, da conjugação das três vertentes acima referidas.

Com efeito, o problema que decidi investigar surgiu da prática clínica, ao observar que após um primeiro episódio de bronquiolite aguda, os lactentes têm evoluções clínicas opostas: enquanto alguns repetem episódios de sibilância durante a infância, noutros tais episódios não se voltam a verificar.

A etiologia das síndromas recorrentes de dificuldade respiratória obstrutiva das vias aéreas inferiores é variável, bem como a sua evolução clínica. O prognóstico depende, naturalmente, da patologia de base mas, mesmo no grupo de doentes com um quadro clínico de *sibilância transitória do lactente* - isto é, naqueles em que os episódios de sibilância se repetem durante os primeiros anos de vida, sem que sejam detectáveis doenças de base (asma, anomalia congénita, refluxo gastroesofágico, défice imunitário, fibrose quística, etc.) - encontramos evoluções clínicas muito diversas.

A questão que se me colocou, sobre a qual reflecti aprofundadamente, foi a seguinte: Porque razão, após uma bronquiolite aguda, algumas crianças têm episódios frequentes de sibilância durante a primeira infância, enquanto outras não voltam a ter eventos semelhantes?

Esta questão motivou-me para a pesquisa exaustiva da literatura e, seguidamente, para a investigação, na população concreta que acompanho (numa consulta de pneumologia infantil de um hospital público, situado numa área urbana da capital de Portugal), dos parâmetros clínicos que efectivamente determinariam a evolução destes lactentes.

Além dos aspectos clínicos e epidemiológicos, considerei importante estudar o ambiente imunológico das vias aéreas destes doentes, colocanco a hipótese de existência de comportamentos diferentes entre determinados subgrupos, sendo possível, eventualmente, detectar de forma precoce perfis bem definidos na população.

Tive oportunidade de colaborar com imunologistas experientes (equipa de bioquímica do Centro de Histocompatibilidade do Sul, coordenada pelo Dr Dário Ligeiro) que investigaram cuidadosamente alguns mecanismos celulares e moleculares implicados na sibilância recorrente. Esta cooperação revelou-se de grande utilidade, por permitir ir além dos aspectos clínicos, adicionando-lhe o estudo de mecanismos básicos e proporcionando-nos oportunidade de aplicação de técnicas de investigação inovadoras e diferenciadas.

Por fim, a componente de ensino surge ligada a esta investigação em duas perspectivas: pela oportunidade de trabalhar em equipa com colegas mais novos; e pela possibilidade de valorizar a minha actividade pedagógica e académica, apresentando-a sob a forma de dissertação de doutoramento.

Quando me convidou para assistente de pediatria da FCM / UNL, o Professor Doutor JM Martins Palminha, na altura regente da disciplina de propedêutica pediátrica, desafiou-me a apresentar uma intenção de doutoramento num prazo de sete anos. Esta era uma das premissas do nosso acordo, e cumprir os compromissos que assumo é um dos meus princípios de vida. Habituei-me, portanto, ao longo dos anos, a ter este objectivo no meu horizonte profissional. Após o falecimento de Martins Palminha e a reformulação curricular do curso, em que a formação pediátrica se passou a concentrar numa disciplina anual única no quinto ano da licenciatura, concretizei, em 2003, a minha intenção de doutoramento junto do Prof Doutor JM Videira Amaral, que tive a honra de ter como orientador.

Após ter concluído com sucesso, em Janeiro de 2007, provas de aptidão pedagógica e capacidade científica, uma dissertação de doutoramento surgiu, desta forma, como corolário lógico da minha actividade académica.

Em suma, responder a questões clínicas colocadas no decurso da actividade assistencial, valorizar as actividades pedagógica e académica, e realizar investigação clínica de qualidade consubstanciam, em meu entender, as três componentes da minha actividade profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este estudo apercebi-me do somatório de esforços, generosidades e boas vontades que contribuíram para a sua realização. Todos os agradecimentos são insuficientes para as pessoas que tornaram possível esta investigação, quer através da sua contribuição directa, quer indirectamente, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Prof Doutor JM Videira Amaral, meu orientador nesta dissertação, agradeço o apoio persistente que me deu ao longo destes anos, as críticas construtivas e perspicazes bem como a enorme confiança que manteve nas minhas capacidades, contrariando, muitas vezes, todas as evidências.

Ao Dr José Carlos Guimarães, meu director de serviço, exprimo o meu reconhecimento pela amizade e estímulo permanente. A sua generosidade, disponibilidade e acompanhamento constante foram fundamentais para mim.

Ao Dr Dário Ligeiro, investigador de bioquímica do Centro de Histocompatibilidade do Sul, agradeço a realização cuidadosa dos estudos laboratoriais, no qual se aplicou de forma generosa, frequentemente com sacrifício dos seus tempos livres.

À Prof Doutora Patrícia Rosado Pinto, agradeço a colaboração que me deu ao longo dos últimos anos no aperfeiçoamento da forma e conteúdo final dos meus trabalhos.

À Dr^a Helena Alves e à “Statscience” agradeço a preciosa colaboração na análise estatística dos resultados.

A Iva Reduto e à “Clio Artes Gráficas” agradeço o excelente trabalho gráfico que contribuiu para valorizar de forma significativa estes volumes.

Aos Drs Ana Caldeira, Edmundo Santos, Marta Aguiar, Mónica Marçal, Nuno Carreira, Nuno Pena, Raquel Santos e Sofia Deuchande, colegas na altura internos de pediatria do serviço, agradeço a colaboração no recrutamento dos doentes para o estudo. Esta investigação não teria sido possível sem a sua cooperação e entusiasmo.

Aos Drs Sofia Lima, Luís Marçal, Isabel Barbosa, Eduarda Sousa, Maria João Leiria, e restantes colegas do serviço, agradeço a generosidade com que compensaram as minhas ausências.

À Dra Sância Ramos (Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Cruz) agradeço a cedência de preparações histológicas originais.

Ao En^o Daniel Lanzas agradeço a colaboração na tradução do resumo para castelhano.

À Associação de Pediatras de S. Francisco Xavier, agradeço a contribuição monetária para a aquisição de reagentes de biologia molecular.

Aos alunos da Faculdade agradeço o estímulo que me proporcionam diariamente.

Aos doentes e suas famílias, pela confiança e colaboração indispensável.

Aos meus pais, irmãs, cunhados, sobrinhos e avó, obrigado por terem ajudado a segurar o leme da minha vida.

Patrícia, Margarida, Mateus: o nosso amor é o único ponto de partida e chegada.

Todas estas pessoas e entidades contribuíram para os aspectos positivos desta dissertação. Os erros, omissões e defeitos são da exclusiva responsabilidade do autor.

INTRODUÇÃO

A sibilância aguda, habitualmente de etiologia vírica (bronquiolite aguda), é extremamente comum na infância. Estima-se que, ao completarem três anos de idade, 30 a 60% das crianças tenham tido, pelo menos, um destes episódios (Flores 2004, Chavez-Bueno 2006, Smyth 2006, Bennett 2007). Cerca de metade desses doentes não volta a ter episódios semelhantes enquanto os restantes evoluem para quadros clínicos de sibilância recorrente de intensidade variável (Singh 2007 Taussig 2008). Várias entidades nosológicas podem manifestar-se desta forma numa fase inicial. Após avaliação complementar, é possível concluir, nalguns casos, pela existência de patologia anatomofuncional, infecciosa, atópica ou outra responsável pela persistência da sintomatologia. Resta-nos, contudo, um número muito significativo de crianças sem diagnóstico preciso, habitualmente enquadradas na definição sindrômica de *sibilância transitória do lactente* (Martinez 2002, Taussig 2003, Ly 2006, Mallol 2007).

Por regra, a evolução destas crianças é favorável ao fim de meses a anos, exigindo, todavia, um acompanhamento médico cuidadoso, que inclui numerosas consultas, episódios de urgência e, por vezes, internamentos hospitalares.

Tratando-se de um diagnóstico de exclusão, é difícil estabelecer estratégias terapêuticas de fundo e definir adequadamente o seu prognóstico. Têm sido identificados alguns factores que contribuem para a recorrência da sibilância nos lactentes: idade, diminuição da função pulmonar, sexo masculino, número de irmãos, frequência de infantário, antecedentes pessoais ou familiares de atopia, infecção por determinados vírus, sensibilização precoce a alérgenos ou tabagismo passivo (Ball 2000, Garcuño 2003, Cifuentes 2003, Fonseca 2003, Friedlander 2005, Martinez 2005, Lazzaro 2006).

Algumas vias imunológicas com participação na etiologia das doenças atópicas encontram-se resumidas na figura 1, e podem ter importância na recorrência de sibilância nalguns lactentes. É de referir, nomeadamente, o predomínio da acção dos linfócitos Th2, com consequente produção e libertação de mediadores inflamatórios pelos neutrófilos, mastócitos, macrófagos e eosinófilos.

Admitimos, portanto, ser possível proceder a doseamentos de alguns mediadores intervenientes nesses fenómenos e correlacioná-los com a evolução clínica das crianças. Como a maioria destes acontecimentos imunológicos e bioquímicos se inicia no epitélio respiratório, procurámos estudá-los a esse nível. Hoje em dia, é dominante a noção de *continuum* fisiológico e imunológico de todo tracto respiratório (Kazachkov 2001, Jones 2001, Bont 2001, Bergoin 2002, Rosado-Pinto 2003, Joshi 2003, Braciale 2005, Pitrez 2005, Midulla 2006, Duramad 2006), ideia que é contestada por autores como Mendes (2004), entre outros. Baseados nessa premissa de contiguidade, estudámos a expressão de determinados mediadores a nível nasal, admitindo a hipótese de correlação com as ocorrências mais distais.

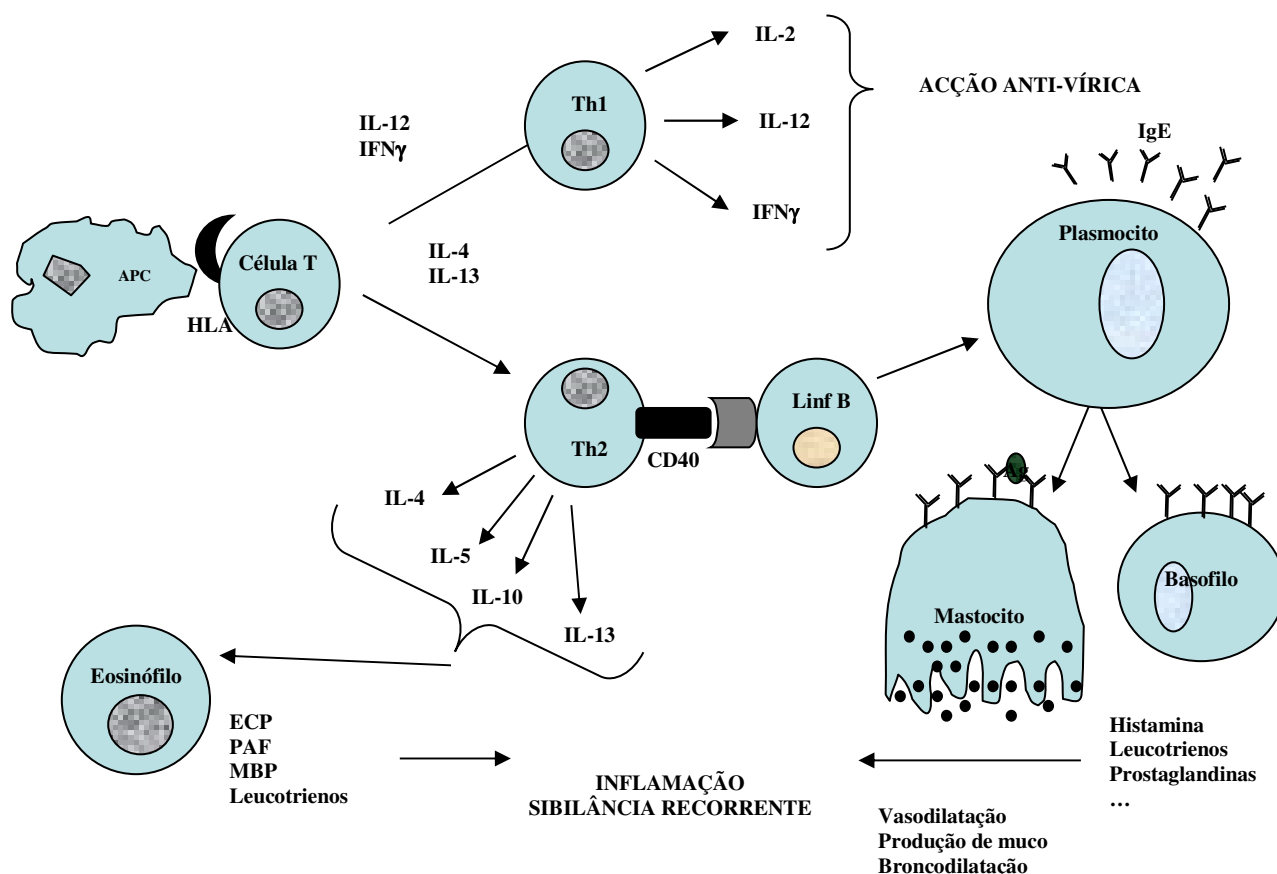


Figura 1: Alguns mediadores participantes na inflamação brônquica. A diferenciação das populações linfocitárias T faz-se nalguns indivíduos (geneticamente determinados e / ou menos expostos a infecções), preferencialmente pela via Th2 (própria dos fenómenos de alergia e hipersensibilidade), em vez de se fazer pela via Th1 (de defesa contra as infecções) (adaptado de Romagnani 2004, Vercelli 2006 e Liu 2006).

Esta dissertação divide-se nas seguintes partes:

1. Fundamentação teórica relativa aos aspectos que serão discutidos e às variáveis consideradas:
 - Descrição de alguns determinantes da função respiratória do lactente, com influência sobre a ocorrência de sibilância recorrente
 - Anatomia, histologia
 - Fisiologia e desenvolvimento
 - Inflamação e imunidade
 - Funções das diferentes citocinas
 - Outros factores (genética, fumo de tabaco)
 - Bronquiolite aguda e vírus responsáveis
2. Descrição da investigação realizada, seguindo os passos habituais:
 - Objectivos
 - Material e métodos
 - Resultados
 - Discussão
 - Conclusões

Os resultados obtidos legitimam, como corolário da investigação, algumas sugestões e recomendações para estudos futuros.

Por fim, enumeram-se as referências bibliográficas consultadas.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

ANATOMIA E HISTOLOGIA DO APARELHO RESPIRATÓRIO DO LACTENTE

O aparelho respiratório, representado esquematicamente na figura 2, é constituído pelas vias aéreas (através das quais o ar é transportado de e para o exterior) e pelo parênquima pulmonar (onde se efectuam as trocas gasosas com a corrente sanguínea).

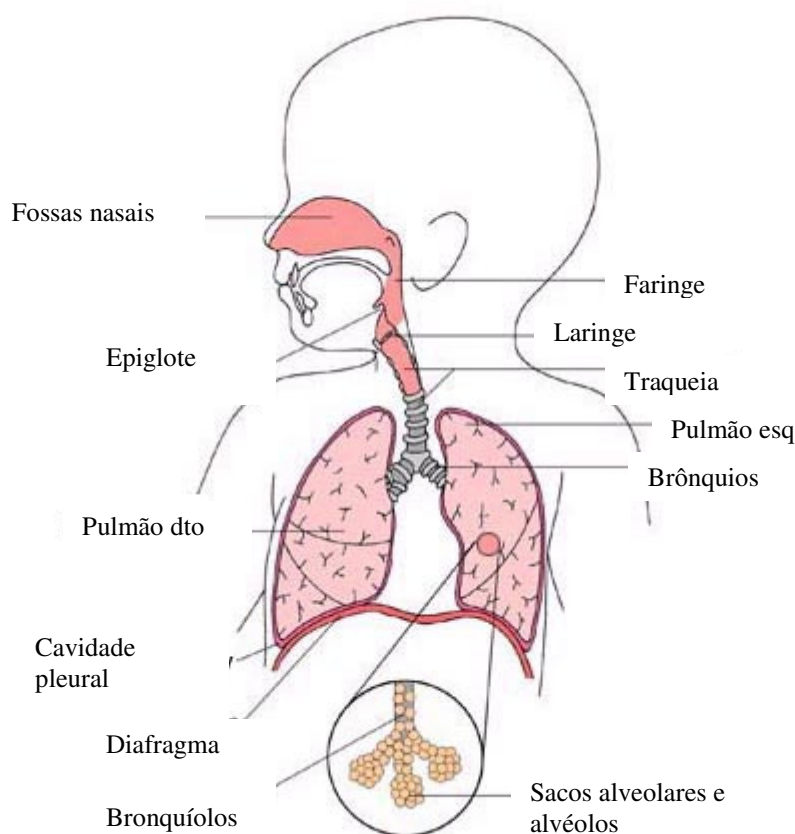


Figura 2: Anatomia do aparelho respiratório no lactente (adaptado de Swartz 1998).

Nas crianças o ar entra, predominantemente, pelo nariz, onde é filtrado, aquecido a 30°C e humidificado a 98% (Silverman 2001, Taussig 2008). As fossas nasais, divididas pelo respectivo septo, comunicam com o exterior através do vestíbulo e, posteriormente, com a nasofaringe, através das coanas. Cada fossa nasal encontra-se subdividida em três andares ou meatos, definidos por septos implantados na parede lateral. Nas suas paredes existem orifícios que comunicam com os seios perinasais.

O fluxo de ar segue, sucessivamente para a faringe, laringe, traqueia, brônquios principais, brônquios subsidiários e bronquíolos, terminando nos alvéolos, onde são feitas as trocas gasosas com a corrente sanguínea (Swartz 1998).

O vestíbulo nasal é coberto por epitélio estratificado. Todas as restantes vias aéreas têm revestimento semelhante, das fossas nasais aos brônquiolos distais: epitélio colunar,

pseudoestratificado, com cinco tipos de células - ciliadas, secretoras de muco, basais, de Clara e neuroendócrinas (Young 2006).

Um corte histológico deste epitélio pode ser observado na figura 3.

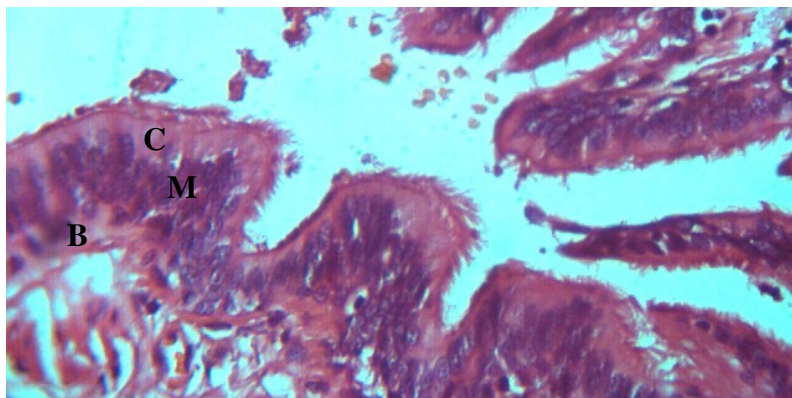


Figura 3: Corte histológico, em microscopia óptica, de epitélio brônquico (HEx400). C: células ciliadas; M: células produtoras de muco; B: células basais. (Imagem gentilmente cedida pela Dr^a Sância Ramos – Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Cruz, 2007).

As células epiteliais são a primeira barreira de proteção da mucosa. Removem, pelos batimentos ciliares, as partículas endoluminais e produzem mediadores imunes. As células produtoras de muco são abundantes na mucosa. As células basais ligam o epitélio à membrana basal e diferenciam-se nas duas linhas celulares referidas. As células de Clara têm funções imunomoduladoras nos bronquíolos terminais. As células neuroendócrinas coordenam a diferenciação destas quatro linhas celulares (Young 2006).

No topo dos cílios situa-se uma camada de muco com espessura de 0,5 a 1 μ m, segregado pelas células produtoras de muco e pelas glândulas submucosas. O muco divide-se em duas camadas: uma mais superficial (gel), que se desloca, pelos movimentos ciliares na direção da orofaringe; outra mais profunda, menos viscosa (sol), que se mantém fixa entre os cílios. A composição do muco inclui glicoproteínas, proteínas plasmáticas (lactoferrina, lisozima, frações de complemento) e mediadores imunológicos (citocinas e interferão). Identificam-se células imunes (linfócitos e células fagocíticas), além de células oriundas da descamação epitelial (Young 2006).

O epitélio assenta na submucosa, constituída por tecido conjuntivo, músculo liso, vasos, cartilagem, nervos e células imunocompetentes (células apresentadores de antígeno (Ag), linfócitos T e linfócitos B). O músculo liso brônquico dispõe-se em duas espirais concêntricas com orientações opostas. Modifica de forma dinâmica o calibre brônquico e segrega mediadores imunitários. A nível das fossas nasais, uma camada vascular substitui o músculo liso: esses vasos respondem a estímulos exógenos e neuronais, regulando a resistência ao fluxo de ar a esse nível (Taussig 2008).

Nos alvéolos, o epitélio é constituído por uma camada celular única, com membrana basal muito fina e em íntima relação com a parede capilar, permitindo as trocas gasosas. Existem também células imunitárias e células com capacidade de síntese de surfactante (Brown 2005, Bisgaard 2006).

DESENVOLVIMENTO DO APARELHO RESPIRATÓRIO

ESTRUTURA

O desenvolvimento do aparelho respiratório inicia-se com a concepção e apenas termina na adolescência. A apresentação clínica, evolução e resposta à terapêutica das diversas doenças do aparelho respiratório dependem do respectivo estágio de desenvolvimento estrutural (Silverman 2001, Taussig 2008).

A figura 4 resume as fases intrauterinas desse processo.

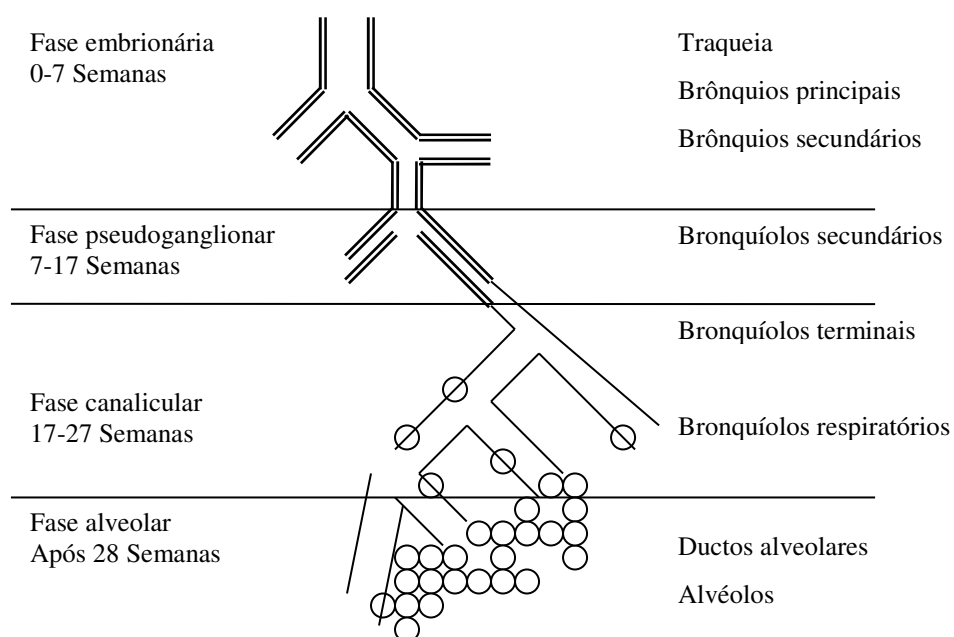


Figura 4: Desenvolvimento do aparelho respiratório (Adaptado de Silverman 2001)

A primeira fase, designada *fase embrionária* (antes das 7 semanas de idade gestacional), consiste no aparecimento de um divertículo endodérmico ventral, que, à quarta semana, se divide pela primeira vez em dois ramos.

As vias aéreas continuam a dividir-se, de forma dicotômica, durante a *fase pseudoglandular* (7-17 semanas). Identificam-se vias aéreas até ao nível pré-acinar (bronquíolos terminais). A diferenciação das estruturas mesenquimatosas (músculo liso, cartilagem, colagénio, vasos sanguíneos, glândulas submucosas) dá-se nesta fase.

Na *fase canalicular* (17-27 semanas), as vias aéreas continuam a dividir-se em bronquíolos de segunda e terceira geração. O epitélio alveolar torna-se suficientemente fino para permitir trocas gasosas.

Na *fase alveolar* (após as 28 semanas), os alvéolos tornam-se mais numerosos e diferenciados. A sua parede torna-se unicelular e tem início a produção de surfactante.

Às 40 semanas, o pulmão está totalmente formado, tendo, no entanto, menos de metade dos alvéolos finais. Após o nascimento, o crescimento das vias aéreas e a capacidade de diferenciação de novo tecido alveolar continua até à adolescência (Landau 2006).

Do ponto de vista histológico, a diferenciação do epitélio inicia-se na vida embrionária, prolongando-se pelos primeiros anos de vida. O número de cílios, o seu comprimento e

coordenação, vai aumentando progressivamente. O número das células produtoras de muco aumenta no primeiro trimestre, em resposta aos estímulos ambientais (Bracken 2002, Bush 2007). A maturidade das células basais e das células de Clara é atingida nos primeiros meses de vida. As células neuroendócrinas aumentam até aos seis meses de vida, tornando-se escassas posteriormente (Christen 2005).

As restantes camadas histológicas sofrem também modificações ao longo dos primeiros meses de vida extrauterina: o músculo liso aumenta, as glândulas submucosas proliferam e a vascularização brônquica diferencia-se (Fireman 2003, Young 2006).

A região alveolar continua a crescer até à adolescência. O padrão de crescimento designa-se por dissinápico: inicialmente, os alvéolos crescem e multiplicam-se, sem alteração do calibre das vias aéreas; ao fim de alguns meses, aumenta o diâmetro das vias aéreas, e estabiliza a dimensão alveolar. Surgem novos vasos sanguíneos, em paralelo com a multiplicação alveolar, garantindo as trocas gasosas (Taussig 2008).

O desenvolvimento estrutural do aparelho respiratório é, em suma, influenciado por diversos factores genéticos e ambientais que interagem a nível molecular, celular e histológico (Holt 2002, Friedlander 2005, Christen 2005, Gern 2006).

FUNÇÃO

Durante a vida intrauterina, o aparelho respiratório encontra-se preenchido por *líquido pulmonar fetal*, segregado activamente pelo epitélio respiratório (pneumocitos tipo I). Esse fluido circula na direcção da faringe, é deglutido e eliminado para o líquido amniótico. A diminuição da produção de líquido pulmonar fetal pode condicionar diversas anomalias como hipoplasia pulmonar. A perturbação desta circulação pode causar dilatação alveolar e enfisema congénito.

Os movimentos rítmicos de expansão e retracção do pulmão fetal, incorrectamente designados “respiração fetal”, têm também importância no desenvolvimento pulmonar intrauterino. Os factores que inibem os movimentos respiratórios fetais, como o fumo de tabaco, podem comprometer o desenvolvimento adequado do aparelho respiratório (Kullig 1999, Diaz-Sánchez 2006).

No primeiro ano de vida, o estudo da fisiologia respiratória é difícil. A técnica utilizada, compressão torácica rápida, mede o fluxo expiratório forçado após aplicação de pressão súbita no tórax e abdómen, no final de uma inspiração de volume corrente. Exige sedação e as medições estão sujeitas a erros significativos (Borrego 2005, Lum 2006).

O perfil funcional respiratório de um lactente tende a manter-se constante ao longo da vida: uma criança com volumes pulmonares baixos mantém essa característica até à idade adulta. Este facto exprime a importância que as alterações precoces podem ter no prognóstico a longo prazo das doenças respiratórias (Martinez 1995).

O desenvolvimento da função respiratória das crianças relaciona-se com o sexo. Os fetos do sexo masculino têm um atraso de maturação de cerca de duas semanas em relação aos do sexo feminino. Como tal, as doenças pulmonares relacionadas com a prematuridade são, em geral, mais graves nos rapazes (Boezen 2004, Uekert 2006). Durante a primeira infância continuam a verificar-se diferenças entre os sexos, nomeadamente maiores volumes expiratórios máximos e menor resistência das vias aéreas entre as crianças do sexo feminino (Borrego 2005, Lum 2006, Nielsen 2006). Este aspecto, cuja explicação ainda não é completa, confere aos lactentes do sexo feminino alguma protecção relativa contra episódios de sibilância. Na adolescência, o panorama inverte-se, pois a testosterona condiciona um aumento de diâmetro das vias aéreas, com diminuição da sua resistência e melhoria da capacidade vital funcional.

Portanto, as diferenças clínicas entre os sexos são influenciadas por factores hormonais e funcionais (Uekert 2006).

Outros factores que actuam sobre o desenvolvimento pós-natal da função respiratória são o contacto com fumo de tabaco (Garcuño 2003, Janson 2004, Lannerö 2006, Patenden 2006, Carroll 2007), a história familiar de asma (Oddly 2002, Henderson 2005, Ramsey 2007), as infecções das vias respiratórias inferiores (Lemanske 2004, Stokes-Peebles 2004, Friedlander 2005, Gern 2006, Oh 2006, Lee 2007) e o controlo farmacológico da sibilância ao longo da primeira infância (Black 2003, Liu 2003, Bisgaard 2006, Panickar 2006).

Em relação ao desenvolvimento da função respiratória na infância e à forma como este influencia a expressão clínica da sibilância recorrente, Martinez e colaboradores (1995) identificaram três fenótipos distintos (figura 5).

- 1 – Sibilância transitória precoce
- 2 – Sibilância persistente
- 3 – Sibilância de início tardio

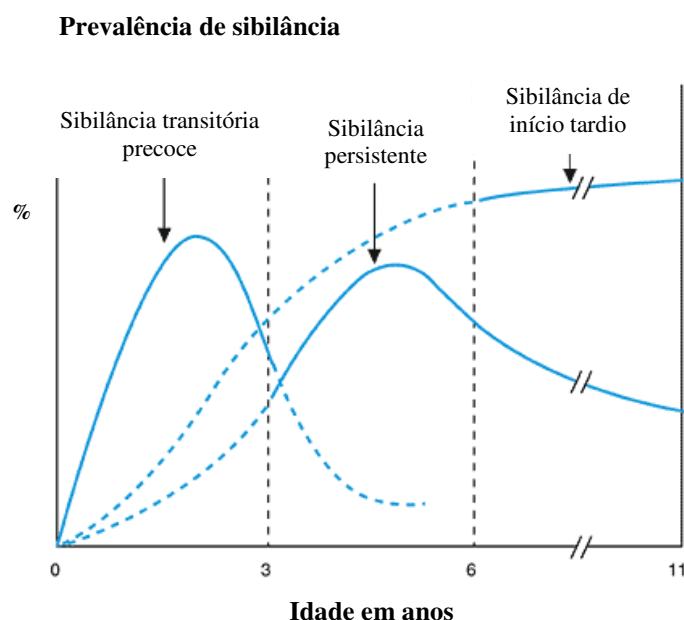


Figura 5: Evolução cronológica dos diferentes tipos de doença sibilante da infância (Martinez 1995).

O primeiro fenótipo, no qual os doentes têm múltiplos episódios de sibilância nos primeiros anos de vida, com evolução favorável até ao terceiro aniversário, corresponde a 65% dos casos de sibilância recorrente detectados nessa idade. As manifestações clínicas são precedidas pela diminuição da função respiratória. O facto de as vias aéreas naquela faixa etária terem menor calibre aumenta a susceptibilidade do doente à inflamação induzida por vírus respiratórios (Martinez 1995, Taussig 2003).

Os comportamentos do segundo e terceiro fenótipos são difíceis de distinguir nos primeiros anos. No entanto, as crianças com sibilância persistente têm, com frequência, história familiar de atopia e antecedentes de eczema. O estudo da função respiratória, efectuado antes do primeiro episódio de sibilância, é normal (Kelley 2005, Castro-Rodríguez 2006).

O esclarecimento de todos os aspectos que influenciam o desenvolvimento da fisiologia respiratória na infância pode ajudar a compreender a evolução dos doentes e a tomar as medidas terapêuticas e preventivas mais adequadas.

INFLAMAÇÃO E IMUNIDADE

A resposta inicial das vias aéreas às agressões é inespecífica: vasodilatação, aumento de permeabilidade capilar, quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos, libertação de substâncias oxidantes e fagocitose. Numa segunda fase, surgem respostas específicas de imunidade humoral (produção de IgA secretória e sérica, IgM, IgG e respectivas subclasses) e celular (linfócitos T e B) (de Meer 2005, Eder 2006).

A nível da submucosa, aumenta a reactividade do músculo liso, o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, com consequente edema. Estes fenómenos podem tornar-se crónicos, com espessamento da membrana basal e hiperplasia do músculo liso (remodelação) (Fireman 2003, Gern 2004, Bush 2006, Guilbert 2006, Graham 2006). Este modelo, característico da asma brônquica, ocorre noutras doenças que cursam com sibilância recorrente, como é o caso, nalguns doentes, do *status* pós infecção por VSR (Brouard 2004, Prescott 2006).

O epitélio do aparelho respiratório é o principal alvo dos agentes infecciosos e a primeira linha de defesa física e imunológica do hospedeiro. As células epiteliais têm capacidade de, após uma infecção, produzir citocinas, quimiocinas, interferão do tipo 1, factores de crescimento, mediadores virucidas e quimiotácticos para neutrófilos, monócitos, eosinófilos, células *natural-killer* e linfócitos T.

Os neutrófilos migram para o local da agressão, invadem o lume respiratório, aderem aos tecidos, agregam-se, libertam mediadores oxidativos e fagocitam substâncias estranhas. Produzem igualmente citocinas que interagem com outras linhas celulares. Estas funções, que ainda não se encontram estabelecidas no recém-nascido, desenvolvem-se rapidamente ao longo dos primeiros meses de vida (Taussig 2008).

Simultaneamente, a mucosa brônquica é invadida por eosinófilos, que libertam potentes mediadores citotóxicos (proteína cationica eosinofílica, peroxidase e proteína básica major), além de prostaglandinas, leucotrienos, e diversas citocinas pró-inflamatórias (Lemanske 2002).

Paralelamente, as células *natural-killer* produzem interferão α , β e outras substâncias que inibem directamente a transcrição vírica (Chaves-Bueno 2006, Bennett 2007).

Os monócitos, macrófagos e células dendríticas desempenham funções de fagocitose e apresentação de Ag às células T (Azevedo 1995, Prescott 2006).

Os mastócitos da submucosa, podem contribuir para a reacção inflamatória, libertando histamina, triptase, prostaglandinas, leucotrienos, IL-4, IL-5, IL-6 e factor de necrose tumoral α (Rosado-Pinto 2003, Montero-Vega 2006).

As terminações nervosas do sistema nervoso autónomo influenciam o calibre brônquico pela libertação de substâncias broncoconstritoras (taquicinina, bradicinina, neurocinina, substância P); ou broncodilatadoras (monóxido de azoto (NO), polipéptido intestinal vasoactivo e neurotransmissores anticolinérgicos) (Smith 2005, Silkoff 2006, Baraldi 2006).

A imunidade celular participa na resposta à infecção por vírus respiratórios por duas vias: após a fagocitose, os macrófagos e células dendríticas apresentam os antígenos virais às células CD4 Th0 (*naives* ou indiferenciadas) que se diferenciam no sentido Th1 ou Th2, conforme revisto adiante; concomitantemente, as células CD8 citotóxicas reconhecem as células epiteliais infectadas, que destroem. A eliminação vírica é, desta forma, acompanhada de lesão tecidual significativa (Mejias 2005, Boelen 2006).

A imunidade humoral inicia-se pela diferenciação e proliferação de linfócitos B, com subsequente síntese de anticorpos específicos: IgA secretória nos primeiros dias após a

infecção; IgM, IgG e IgA séricas de forma sequencial, ao longo dos dias a semanas seguintes. Estas moléculas são pouco importantes no combate à infecção aguda mas fundamentais na resposta contra as reinfecções. Nalguns indivíduos verifica-se um aumento de anticorpos de tipo IgE com afinidade contra o VSR que, sendo inútil na resposta à infecção, pode contribuir para perpetuar a sibilância recorrente (Black 2003, Smyth 2006, Bennett 2007).

Linfócitos T– Paradigma Th1/Th2

Na vida fetal, a principal função imunitária da unidade fetoplacentária consiste em evitar os processos de rejeição materna. Para a mãe, o feto é um corpo imunologicamente estranho que, na ausência de controlo, seria considerado como um aloenxerto e rejeitado. Para o evitar, desenvolveram-se mecanismos de tolerância. Na unidade feto-placentária predomina o ambiente Th2 (com produção de IL-4 e IL-13), que inibe a rejeição imunitária, contrariando a citotoxicidade das células Th1 (conferida por IL-12 e interferão- γ). Este fenómeno adaptativo deve-se, provavelmente, à regulação da expressão fetal e placentária dos respectivos genes (Silvestri 2004, Uekert 2006, Prescott 2006, Pinto 2006, Truyen 2006, You 2006, Neaville 2006, Singh 2007).

No sangue do recém-nascido predominam os linfócitos CD4 com perfil Th0 (indiferenciados) ou Th2, além de linfócitos B e de células *natural killer*. Ao longo da primeira infância, os linfócitos Th0 vão-se diferenciando nas linhas Th1 ou Th2 (Bracken 2002, Brown 2005). A resposta adequada às infecções virais e bacterianas é feita pela via Th1. A via Th2 é útil no combate contra infestações helmínticas. Com a diminuição destas no mundo ocidental e a concomitante diminuição de contacto das crianças com Ag bacterianos, admite-se que o sistema imunitário seja desviado para reacções de hipersensibilidade (cutânea ou respiratória), em que são activadas as vias de predomínio Th2. Este é o fundamento da chamada *hipótese higiénica* (Rosado-Pinto 2003, Romagnani 2004, Rebordão 2005, Bloomfield 2006).

O comportamento dos linfócitos T após contacto com VSR durante a primeira infância reveste-se de algumas particularidades. Vários autores, como Bont (2001), Ogra (2004), Stokes-Peebles (2005), Braciale (2005), Pinto (2006) ou Becker (2006), publicaram estudos em que discutem a imunidade errática associada ao VSR. Com efeito, nalguns doentes parece haver uma resposta imunitária adequada após contacto com VSR, com predomínio Th1 e produção de IL-12 e IFN- γ , citocinas úteis no combate às infecções virais. Noutros, verifica-se um predomínio Th2, com produção de IL-4 e IL-13. Estes factos podem ajudar a explicar a ocorrência de hiperreactividade brônquica como sequela, nalguns lactentes.

Do ponto de vista do metabolismo vírico, conforme referido por Hacking (2002), Legg (2003), Aoyagi (2003), Spann (2004), Lindemans (2005), Braciale (2006) e Bennett (2007), a proteína G do VSR desencadeia, em modelos experimentais, eosinofilia e estimulação de citocinas das vias Th2 (IL-4 e IL-13). A proteína F, pelo contrário, estimula as vias Th1 e as células *natural killer*, com produção de IL-12 e IFN- γ . Este processo contribui para eliminação mais eficaz do vírus e uma evolução mais rápida e benigna da doença (Boelen 2002, Aoyagi 2003, Legg 2003, Psarras 2004, Garofalo 2005, Becker 2006, Bennett 2007).

O predomínio relativo de cada uma das diferentes respostas do hospedeiro (Th1 ou Th2), poderá influenciar a gravidade da bronquiolite e subsequente evolução para sibilância recorrente.

Remodelação

A asma é definida, actualmente, como uma doença inflamatória das vias aéreas que cursa com crises recorrentes de tosse, sibilância e dispneia. Esta definição tem pontos de contacto com outras doenças das vias aéreas, como sibilância transitória do lactente ou doença pulmonar obstrutiva crónica (Rosado-Pinto, 2003, Ogra 2004, Silvestri 2004, Bisgaard 2006, Baraldi 2006, Lemanske 2006, Eder 2006, Maclellann 2006).

O mecanismo patológico predominante destas situações é a inflamação, de que resulta congestão vascular, edema da mucosa, contracção do músculo liso e acumulação intraluminal de muco e detritos celulares. A proporção relativa de cada um destes fenómenos é variável, durante as exacerbações ou nos períodos intercríticos, sendo o processo, habitualmente, reversível (Lemanske 2006).

Ao evoluir para a cronicidade, pode surgir um componente irreversível, designado por remodelação, o qual se traduz por espessamento da parede dos brônquios, hiperplasia do músculo liso e diminuição permanente do lume (Lemanske 2006).

Este processo crónico é complexo, assemelhando-se à cicatrização da pele. Numa primeira fase, após a lesão das células epiteliais, surge edema, proliferação e migração de células de locais não lesados. São convocados neutrófilos, plaquetas, macrófagos e linfócitos. Os miofibroblastos indiferenciados da submucosa multiplicam-se, formam aglomerados ectópicos de tecido muscular liso, e produzem reticulina, fibrina e colagénio. Aumenta igualmente a síntese de endotelina, com neovascularização brônquica (Rosado-Pinto 2003).

Se a agressão persistir (Ag, infecções ou fumo do tabaco, entre outros), estão reunidas as condições para se manter a inflamação e a remodelação, com evidentes efeitos prejudiciais a longo prazo (Reed 2006).

Os acontecimentos a nível celular e molecular das doenças sibilantes nos primeiros anos de vida são mal conhecidos (Gern 2006, Graham 2006). Esclarecer quais destes fenómenos ocorrem na sibilância transitória da infância, bem como a fase em que as respectivas alterações se tornam irreversíveis, são importantes linhas de investigação em curso.

METODOLOGIAS DE ESTUDO DA INFLAMAÇÃO E IMUNIDADE EM DOENÇAS SIBILANTES

Vários autores têm avaliado em laboratório a actividade inflamatória brônquica nas doenças sibilantes infantis. É possível colher, com esse objectivo, amostras biológicas de tecido brônquico (por biópsia, escovado, lavado broncoalveolar ou expectoração induzida) ou mais proximal (secreções faríngeas, nasais ou determinações a nível do ar expirado). Esta última metodologia pode traduzir com fidelidade as alterações distais, dada a continuidade anatómica e funcional do aparelho respiratório (Bergoin 2002, Rosado-Pinto 2003, Braciale 2005, Pitrez 2005, Midulla 2006, Duramad 2006).

No lavado broncoalveolar, têm sido estudadas diversas populações celulares (linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos) e citocinas. Estes estudos têm contribuído significativamente para ampliar o conhecimento nesta área, mas enfrentam dificuldades inerentes às implicações éticas em pediatria (Azevedo 1995, Krawiec 2001, Jones 2001, Mobbs 2002, Boelen 2002, Kim 2003, Brown 2003, McNamara 2004, Copenhagen 2004, Brown 2005, Braciale 2005, Phaybouth 2006, Maclellan 2006).

No material proveniente de expectoração induzida (Truyen 2006) têm sido efectuadas determinações semelhantes. Esta metodologia não invasiva é atraente, permitindo, após estimulação adequada com aerossóis hipersalinos, detectar alguns mediadores bioquímicos e celulares em material proveniente dos brônquios. No entanto, utilizando tal técnica, dificilmente se consegue obter amostras suficientes em crianças pequenas.

No ar expirado é também possível medir níveis de NO; trata-se do produto final da actividade de diversas reacções que ocorrem nas vias aéreas dos doentes asmáticos, o que resulta da acção dos eosinófilos e células neuronais. O NO é um bom marcador de actividade inflamatória brônquica, havendo uma relação directa entre o respectivo nível detectado no ar expirado e a actividade inflamatória endoluminal (Baraldi 2006).

No vapor de água expirado é possível quantificar mediadores como leucotrienos e peróxido de hidrogénio, metodologia que aguarda validação clínica (Shahid 2002).

Em produtos biológicos oriundos das fossas nasais, os resultados dos estudos de imunidade podem ser correlacionados com os fenómenos que ocorrem a nível das vias aéreas distais. A “via aérea única” é, actualmente, uma noção consensual. É possível, através de lavado, aspirado ou escovado da mucosa nasal, obter informações fiáveis sobre alguns processos inflamatórios brônquicos (Bont 2001, Gern 2002, Joshi 2003, Legg 2003, Garofalo 2004, Giugno 2004, Pitrez 2005, Tripp 2005, Midulla 2006).

Uma das possíveis linhas de investigação é o estudo das citocinas inflamatórias, nomeadamente as responsáveis pela determinação do tipo predominante de resposta imunitária (Th1 ou Th2). Estas substâncias são extremamente lábeis, instáveis e com período de semivida curto. Como tal, há necessidade de recorrer à determinação da expressão dos ácidos nucleicos que as codificam. Na maioria dos casos, é estudado o ARNm, cuja expressão é detectável de forma fiável (McNamara 2004, Feleszko 2006 e Sutton 2007).

Recordam-se, na figura 6, as principais etapas da síntese proteica:

1. Transcrição de ADN em ARNm, por acção da polimerase do ARN
2. Tradução, a nível do ribossoma, da mensagem contida no ARNm
3. Transporte de aminoácidos, pela acção do ARN de transporte (ARNt)
4. Formação de cadeia de polipéptidos, de acordo com a informação genética.

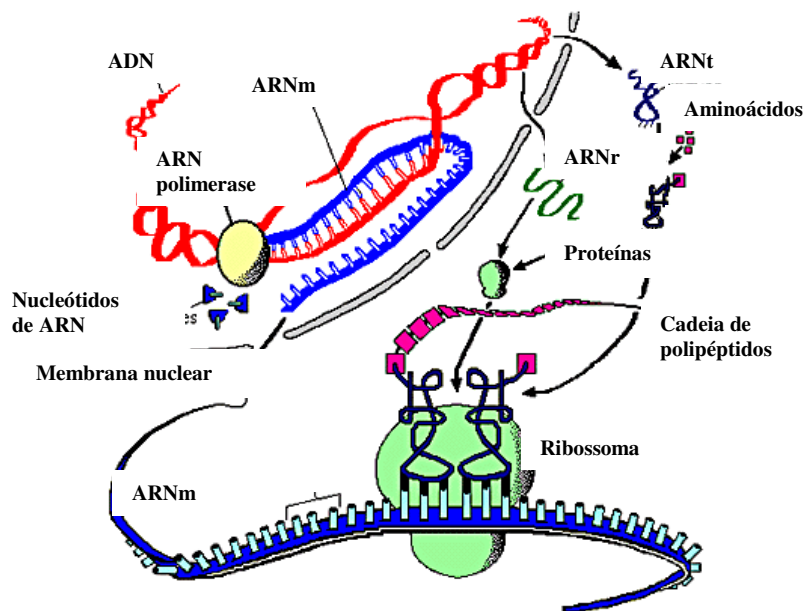


Figura 6: Representação esquemática da síntese proteica.

Na urina e no sangue pode quantificar-se directamente diversas substâncias, como proteínas eosinofílicas ou leucotrienos, salientando-se a dificuldade em afirmar, em definitivo, a correlação destes valores com os fenómenos endobrônquicos.

Os monócitos circulantes têm sido objecto de vários estudos, principalmente pela sua capacidade de síntese de citocinas após estimulação em meio de cultura. No entanto, a sua actividade poderá não estar relacionada directamente com os fenómenos que ocorrem nas vias aéreas (Bont 2000, Kimpen 2002, Aoyagi 2003, Noakes 2003, Guerra 2004, Heaton 2005, Guerrero 2005, Friedlander 2005, Braciale 2005, Pinto 2006, Uekert 2006, Rebordão 2006, Ly 2007, Ermers 2007).

CITOCINAS

O paradigma Th1 / Th2 da imunidade celular desempenha um papel fundamental nas vias respiratórias. Há citocinas que se destacam nestes mecanismos, uma vez que são produzidas exclusivamente pelas linhas celulares em causa: duas pelos linfócitos Th1 (IFN- γ e IL-12) e duas pelos linfócitos Th2 (IL-4 e IL-13).

A figura 7 ilustra o papel central destas substâncias.

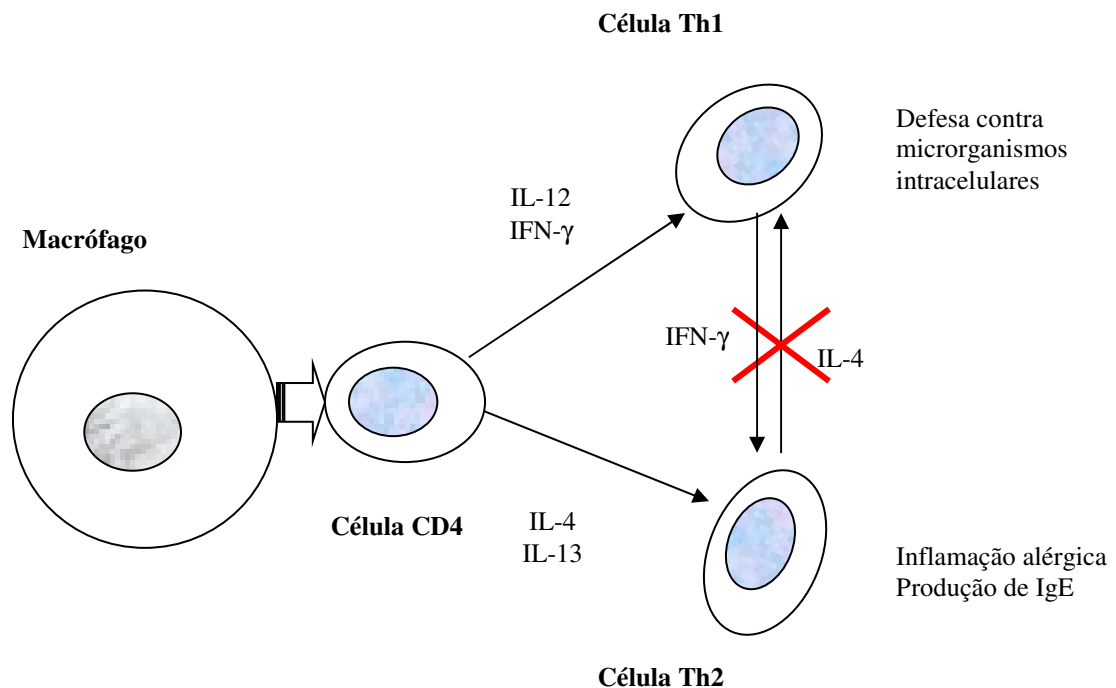


Figura 7: Esquema muito simplificado do paradigma celular Th1 e Th2 (Adaptado de Truyen 2006).

Interleucina 4 (IL-4)

A interleucina 4 (IL-4) é uma glicoproteína constituída por quatro hélices.

A sua síntese é codificada a partir da expressão de genes situados nos locos *q23* e *q31* do cromossoma 5.

É produzida exclusivamente pelas células Th2.

Desempenha um papel central na regulação da actividade humoral e adaptativa, estimulando a proliferação e activação de mastócitos e células B e T, bem como a diferenciação de linfócitos CD4⁺ para células Th2. A IL-4 induz as células B a produzirem IgE e activa a produção de Ag de histocompatibilidade de classe II (Truyen 2006).

Interleucina 13 (IL-13)

A interleucina 13 (IL-13) é uma glicoproteína constituída por quatro hélices, análoga em grande medida a IL-4.

O gene responsável pela sua codificação situa-se no locus *q31* do cromossoma 5.

É produzida por vários tipos celulares, especialmente pelas células Th2, constituindo um importante mediador dos processos alérgicos.

As funções de IL-13 sobrepõem-se às de IL-4, principalmente no que diz respeito à activação das diversas linhas celulares: activa a síntese de IgE pelas células B activadas, induz hiperreactividade, hipersecreção de muco e recrutamento de células inflamatórias. Colabora na eliminação de Helminthos intestinais (Kazachkov 2002, Truyen 2005).

Interleucina 12 (IL-12)

A interleucina 12 (IL-12) é uma citocina constituída por quatro cadeias polipeptídeas helicoidais.

Dois genes, situados nos locos *p12* e *q13.2* do cromossoma 3, codificam a sua síntese.

É produzida por macrófagos e células T em resposta a estímulos antigénicos. Participa na diferenciação de células Th0 para Th1, estimulando o seu crescimento e diferenciação, bem como a síntese de IFN- γ e factor de necrose tumoral. Estimula a multiplicação de células *natural killer*. Inibe a produção e contraria a acção de IL-4 (Tripp 2005).

Interferão- γ (IFN- γ)

O interferão-gama (IFN- γ) é uma citocina constituída por um dímero formado pela interconexão anti-paralela de dois monómeros. Cada monómero é constituído por cadeias helicoidais colocadas em sequência e interpoladas por sequências polipeptícas não-helicoidais.

Um único gene, situado no locus *q24.1* do cromossoma 12, codifica a sua produção.

É sintetizado pelas células *natural killer*, linfócitos Th1 e CD8.

O IFN- γ tem funções antivirais, imunorreguladoras e antitumorais. Altera a transcrição de trinta genes envolvidos em inúmeros processos fisiológicos e celulares. A sua acção depende da integridade do dímero e da interacção com os receptores específicos.

Activa as células apresentadoras de Ag e promove a diferenciação das células Th0 para Th1, das quais é igualmente o principal marcador (Kazachkov 2002, Truyen 2005, Teixeira 2005).

OUTROS FACTORES DETERMINANTES DA ESTRUTURA E FUNÇÃO BRONQUIOLAR

Genética

A etiologia da sibilância transitória do lactente depende de factores ambientais e genéticos. Estes últimos podem explicar as diferentes incidências populacionais, bem como as discrepâncias na evolução clínica e na resposta à terapêutica (Ermers 2007).

Existem diversos genes envolvidos, uma vez que a hereditariedade não segue, nestas patologias, leis mendelianas (Arora 2006, Bisgaard 2006, Eder 2006, Stensdalle 2006, Videira 2006).

Os genes que condicionam a concentração, morfologia ou capacidade funcional dos vários mediadores inflamatórios são importantes na definição da evolução clínica (Sengler 2002, Videira 2006).

O efeito de outros factores, como o fumo de tabaco, pode ser modulado igualmente por diferentes polimorfismos genéticos (Sadeghnejad 2008).

A resposta à terapêutica é também modificada por polimorfismos genéticos. A eficácia dos fármacos β 2-miméticos, por exemplo, depende da estrutura do respectivo receptor, que é controlada pela expressão de um gene. Os polimorfismos desse gene dão origem a respostas individualizadas a esses fármacos (Ermers 2007, Sengler 2002).

Os recentes avanços científicos no campo da genética molecular têm permitido ampliar o conhecimento das diversas vias metabólicas. No campo da imunologia e do estudo da inflamação têm sido reconhecidos inúmeros mediadores séricos e teciduais que intervêm nestes fenómenos. A sua identificação, isolamento e determinação funcional é complexa, uma vez que estas moléculas são produzidas em quantidades ínfimas, têm semividas breves e, em ambiente laboratorial, degradam-se com facilidade. Sendo estas proteínas (citocinas, quimiocinas, etc.) sintetizadas a partir da informação contida no ADN, a metodologia que tem tido mais sucesso baseia-se no estudo dos ácidos nucleicos que as originam e não, de forma directa, nas proteínas em causa. É possível pois, a partir de uma amostra celular, amplificar os ácidos nucleicos (moléculas resistentes e estáveis) responsáveis pela síntese de determinada proteína e determinar, indirectamente, a respectiva actividade nas diversas situações (Sengler 2002, Bracken 2002, Bush 2007).

Fumo de tabaco

Datam de 1974 os primeiros estudos sobre os malefícios do fumo de tabaco sobre as crianças. Verificou-se inicialmente que os lactentes que conviviam com fumadores tinham maior risco de pneumonia ou bronquiolite grave, com maior morbilidade e mortalidade. Desde então foram publicados mais de 3500 artigos científicos que referem efeitos prejudiciais do tabagismo passivo, pré- ou pós-natal.

O tabaco é o poluente atmosférico que mais frequentemente afecta as crianças, prejudicando o desenvolvimento dos seus sistemas imunitário e respiratório. Cerca de 50% das crianças convive diariamente com fumadores, inalando, individualmente, o equivalente a 50 a 150 cigarros por ano, conforme o número e tipo de cigarros consumidos, o tempo diário de exposição, a proximidade física e o tamanho e ventilação da casa (Behr 2002, Janson 2004, Groner 2005, Diaz-Sanchez 2006, Le Soeuf 2006).

O fumo de tabaco inclui, na sua composição, nicotina, monóxido de carbono, amónia, formaldeído, óxidos de azoto, benzeno, nitrosamina e mais de quarenta carcinogénios conhecidos (Mitchell 2002). A intensidade do contacto passivo com fumo de tabaco pode ser quantificada através da medição da cotinina, metabolito da nicotina doseável no soro, saliva, urina, cabelo e meconio. A estimativa do consumo de tabaco através de questionários aos pais peca normalmente por defeito (Groner 2005).

O tabaco tem efeitos nocivos sobre o feto (aborto espontâneo, restrição de crescimento intrauterino, alteração do desenvolvimento pulmonar, prematuridade), o lactente (síndrome de morte súbita, maior incidência de infecções respiratórias, tosse crónica, sibilância recorrente), a criança mais velha (maior incidência de crises de broncoespasmo e infecções respiratórias) e o adulto (doença pulmonar crónica obstrutiva, neoplasias, doenças cardiovasculares) (Janson 2004, Diaz-Sanchez 2006, Pattenden 2006).

A nicotina e o monóxido de carbono presentes no sangue materno diminuem o fluxo sanguíneo da placenta e a amplitude e frequência dos movimentos torácicos fetais, comprometendo, dessa forma, o crescimento e diferenciação do aparelho respiratório. Por outro lado, a hipóxia crónica leva à libertação de catecolaminas, acelerando a maturação pulmonar. Este facto explica que os filhos de mães fumadoras tenham maior risco de prematuridade mas, paradoxalmente, menor incidência e gravidade de doença das membranas hialinas (Kulig 1999, Noakes 2003, Janson 2004).

Após o nascimento, a inalação crónica de fumo de tabaco altera a função dos cílios e modifica a função imunitária, o que se traduz no aumento da incidência e gravidade dos sintomas respiratórios da infância (Feleszko 2000, Phaybouth 2006, Carroll 2007).

BRONQUIOLITE AGUDA

Etimologicamente, a palavra “bronquiolite” resulta da conjugação do termo grego “bróghkhia” (brônquio) com os sufixos latinos -olo (pequeno) e -ite (inflamação). Definindo, de forma estrita, uma entidade histológica, passou posteriormente a designar um diagnóstico clínico (Silverman 2001, Long 2002, Taussig 2008).

A maioria dos casos de bronquiolite aguda é de etiologia vírica. Os agentes mais frequentes são VSR (50 a 90% dos casos), Parainfluenza, Rinovirus, Influenza, Adenovírus e Metapneumovirus humano. Raros casos têm sido atribuídos a *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma pneumoniae* (Long 2002). O nosso grupo detectou uma incidência de 60,9% de VSR em casos de bronquiolite aguda na região de Lisboa (Flores 2004).

A bronquiolite aguda é uma doença comum nos dois primeiros anos de vida, principalmente entre os dois e os seis meses de idade. A maior incidência acontece, em Portugal, de Novembro a Abril (Rosado-Pinto 2003, Flores 2004).

Do ponto de vista fisiopatológico demonstra-se necrose e descamação de células epiteliais, inflamação da mucosa das pequenas vias aéreas, aumento da produção de muco, alteração da produção de surfactante, edema da submucosa e broncospasmo. Da conjugação destes fenómenos resulta obstrução distal das vias aéreas. Na expiração, o lume destas diminui, com acumulação distal de ar, aumento do esforço respiratório e do volume pulmonar no final da expiração e diminuição da *compliance* pulmonar (Lindemans 2005, Bennett 2007).

O diagnóstico de bronquiolite é, para o pediatra, linear e intuitivo, principalmente no decorrer das epidemias anuais. No entanto, a ausência de definições standardizadas coloca dificuldades ao clínico e ao investigador. Com efeito, verifica-se uma grande variabilidade entre os observadores no que diz respeito a valorização da polipneia, tiragem e alterações auscultatórias (Voets 2006, Smyth 2006).

A síndrome clínica inicia-se pela infecção das vias aéreas superiores, com obstrução nasal, rinorreia, tosse e hiperemia da orofaringe, com ou sem febre. Após dois ou três dias, o envolvimento das vias aéreas inferiores torna-se evidente, com agravamento da tosse e da dificuldade respiratória. A dificuldade alimentar, associada a letargia, vômitos e polipneia, pode condicionar desidratação. Em recém-nascidos e ex-prematurados a apneia é uma apresentação clínica possível (Smyth 2006). O exame físico pode evidenciar sinais de dificuldade respiratória (polipneia, tiragem, adejo nasal, cianose), sibilos e fervores à auscultação pulmonar e sinais de desidratação.

Os resultados dos exames complementares de diagnóstico são inespecíficos. A radiografia do tórax pode ser normal ou apresentar diversos padrões (hiperinsuflação, reforço intersticial, condensação, atelectasia), que não se relacionam com a gravidade da doença. A medição transcutânea da saturação da hemoglobina em oxigénio (SpO₂) é útil na avaliação da gravidade da situação (Wang 1992, Meats-Dennis 2005). A pesquisa de vírus respiratórios nas secreções respiratórias pode ser feita por método imunoenzimático, imunofluorescência ou amplificação em cadeia de polimerase (PCR). É importante para agrupar doentes e evitar terapêuticas antibióticas desnecessárias. O diagnóstico serológico e a identificação do vírus em cultura celular são demorados, com escassa utilidade na prática clínica (Smyth 2006). A realização de hemograma ou do doseamento de proteína C reactiva não é, habitualmente, útil.

A terapêutica da bronquiolite é sintomática. A administração de oxigénio suplementar deve ser suficiente para manter a SpO₂ superior a 92%. A hidratação por via oral e/ou

endovenosa, deve cobrir 80 a 100% das necessidades diárias. As alterações iónicas devem ser corrigidas (Chavez-Bueno 2006, Smyth 2006). Os broncodilatadores, β_2 -agonistas (salbutamol, procaterol, terbutalina) têm sido utilizados na terapêutica sintomática da bronquiolite, com algum benefício sintomático, embora sem alteração na duração da doença. A adrenalina em aerossol, pelo seu efeito α e β adrenérgico, com broncodilatação e diminuição de edema da mucosa brônquica, tem sido igualmente usada em meio hospitalar. Em muitos centros é prescrita uma dose inicial de broncodilatadores ou adrenalina por via inalatória, que, se for eficaz, é mantida durante três a quatro dias (Meats-Dennis 2005, Smyth 2006). Os corticosteróides sistémicos ou inalatórios não são aconselhados na terapêutica da bronquiolite, não diminuindo, nomeadamente, a incidência de sibilância recorrente posterior (Kimpfen 2002, Smyth 2006). Numa metanálise recente (Perrotta 2007) não se demonstrou benefício da cinesiterapia respiratória na terapêutica da bronquiolite aguda. Recomenda-se, apenas, para complicações atelectásicas. A antibioticoterapia está indicada para sobreinfecções bacterianas ou, empiricamente, no lactente com bronquiolite e suspeita de sepsis. O uso de antivíricos ou de anticorpos passivos não é recomendado (Mejías 2005, Smyth 2006). Alguns doentes com insuficiência respiratória aguda ou apneia podem necessitar de ventilação assistida, não invasiva ou convencional. Actualmente, têm sido estudadas novas opções terapêuticas para a bronquiolite aguda, como interferão, vitamina A, surfactante exógeno, heliox, desoxirribonuclease recombinante e algumas ervas chinesas. A eventual utilidade destas medidas aguarda confirmação (Chaves-Bueno 2006, Smyth 2006).

Cerca de 1 a 2,5% dos doentes necessitam de internamento hospitalar, mais frequentemente em lactentes com idade inferior a seis semanas de idade, do sexo masculino, que frequentem o infantário, tenham tido baixo peso ao nascer ou sejam portadores de doença crónica (pulmonar, cardíaca, neuromuscular ou imunodeficiência). As crianças com história de contacto pré- e pós-natal com fumo de tabaco, bem como alguns grupos de risco sócio-económico apresentam igualmente maior risco. A mortalidade é inferior a 2/100.000 casos (Carroll 2007).

Na maioria dos doentes a melhoria clínica ocorre em três a quatro dias após o início do quadro respiratório das vias aéreas inferiores. As complicações principais são as sobreinfecções bacterianas, como otite média aguda, traqueíte ou pneumonia. Abaixo dos três meses, podem ocorrer episódios de apneia. Nestas situações, bem como em atelectasias graves e exaustão muscular, pode surgir insuficiência respiratória aguda. Outras complicações possíveis são os desequilíbrios hidroelectrolíticos (por desidratação ou secreção inapropriada de hormona antidiurética) e a encefalopatia por compromisso do sistema nervoso central pelo próprio vírus (Long 2002, Red Book 2006).

As medidas preventivas são as habituais em infecções com transmissão aérea (lavagem das mãos, limitação de contactos com secreções, evicção de infantário, junção nas enfermarias de doentes com o mesmo diagnóstico) (Smyth 2006). O fumo de tabaco, antes ou após o nascimento, é referido como um factor que aumenta a gravidade da bronquiolite aguda, pelo que deve ser desaconselhado (Kimpfen 2002, Voets 2006).

AGENTES ETIOLÓGICOS DE BRONQUIOLITE AGUDA

Vírus sincicial respiratório (VSR)

Pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus*. É um vírus ARN de cadeia única. O seu nome deve-se ao padrão histológico das células infectadas, em que é nítida a formação de sincícios (figura 8) (Bennett 2007).

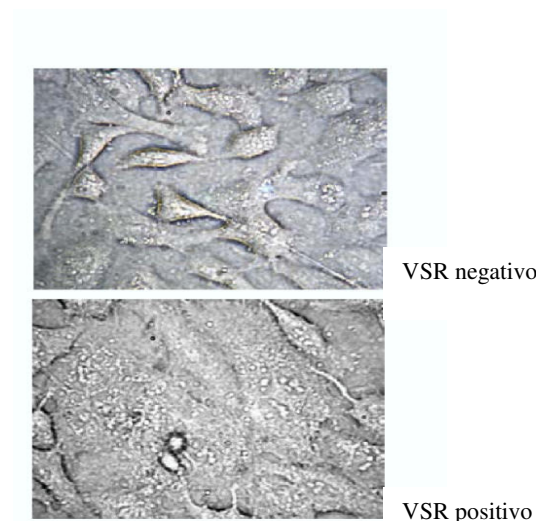


Figura 8: Cultura de células de epitélio nasal após infecção por VSR, com formação de sincícios (Bitko 2004).

A estrutura do VSR (figura 9) inclui: uma nucleocápside onde se situa o ARN e as enzimas responsáveis pela sua transcrição e polimerização; e uma região periférica onde se encontram as proteínas de adesão e fusão (Black 2003, Bennett 2007).

O passo inicial do metabolismo do VSR é a adesão da proteína G a um receptor celular ainda não identificado. A proteína F permite a fusão do vírus com a membrana celular, desorganiza o citosqueleto e induz a formação de sincícios (Spann 2004). As enzimas da célula são usadas na produção das proteínas virais. A proteína M coordena a reunião das várias partículas virais (Bennett 2007).

O VSR infecta as células epiteliais do aparelho respiratório, desde as fossas nasais aos bronquíolos distais. Raramente, pode ser atingido o sistema nervoso central (Long 2002, Red Book 2006).

Cerca de 70% das crianças são infectadas no primeiro ano de vida e 100% até ao terceiro aniversário. Ocorre bronquiolite aguda em 40 a 60% dos casos. Alguns doentes têm envolvimento isolado das vias aéreas superiores. É frequente que a infecção por VSR ocorra sem febre (Long 2002, Red Book 2006).

A presença de VSR pode ser demonstrada no lavado ou aspirado nasal por testes de imunofluorescência, imunoabsorção ligada a enzima (ELISA), PCR ou cultura (Smyth 2006, Red Book 2006).

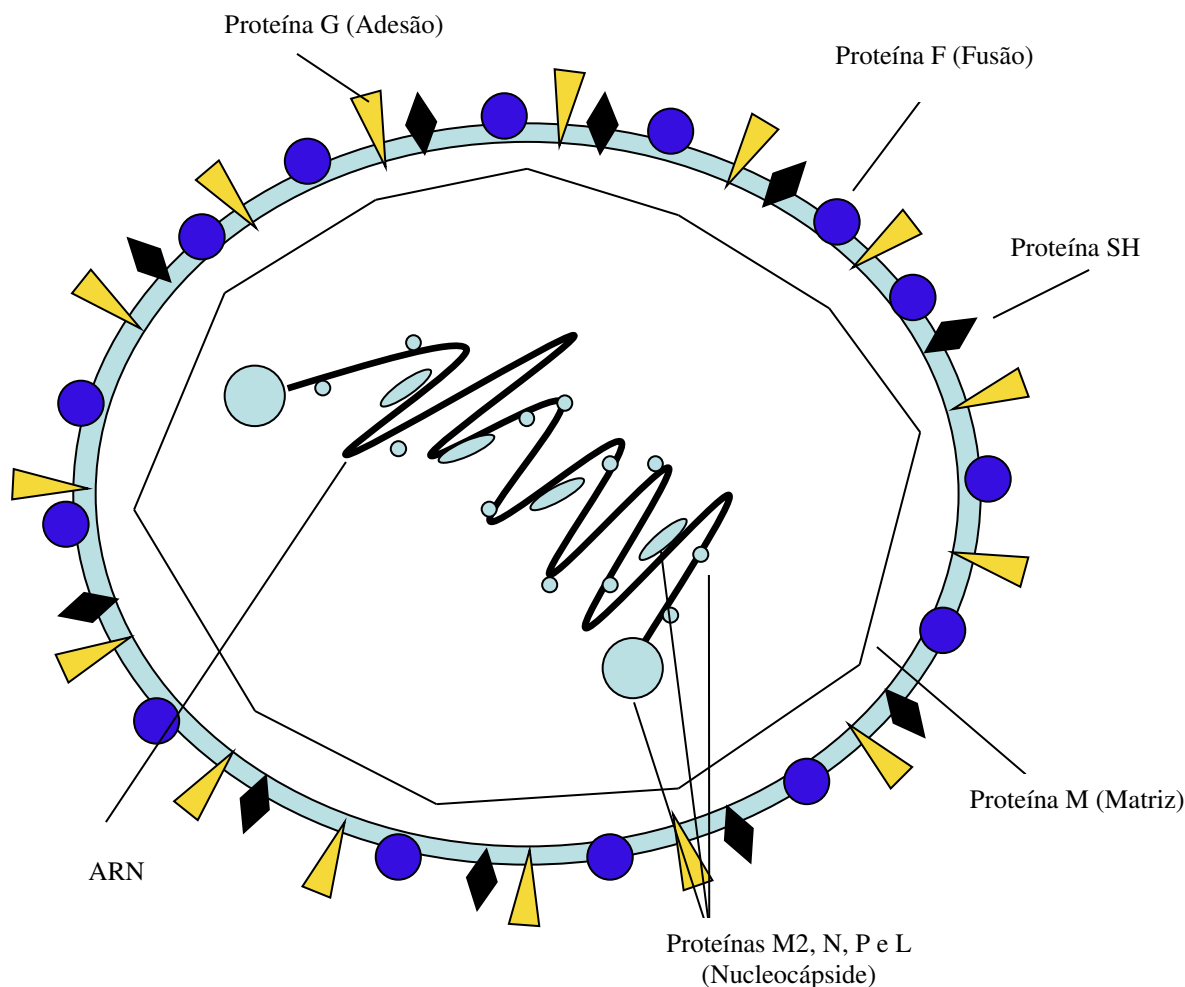


Figura 9: Representação gráfica da estrutura de VSR. (Adaptado de Hacking 2002)

A ribavirina em aerossol é o único fármaco eficaz contra o VSR. O seu uso limita-se a lactentes ventilados. É um fármaco reconhecidamente teratogénico (Smyth 2006).

O palivizumab, anticorpo monoclonal humanizado com efeito neutralizante contra VSR, liga-se à proteína vírica F, e impede a formação de sincícios e a consequente propagação do VSR no epitélio. O seu uso é actualmente recomendado em grandes prematuros e portadores de cardiopatia congénita grave, com elevada eficácia mas com custos elevados (Franco 2006).

A vacinação seria importante na prevenção da infecção por VSR. A sua administração deveria ser feita, idealmente, no período neonatal ou, eventualmente à mãe, no final da gravidez. No entanto, a imunidade herdada da mãe ou induzida no hospedeiro é, neste caso, mal compreendida, o que constitui um obstáculo ao desenvolvimento de vacinas eficazes (Kimpen 2002, Joshi 2003, Becker 2006). Uma vacina anti-VSR desenvolvida da década de 1960 teve graves problemas de eficácia e segurança. As crianças vacinadas sofreram formas muito graves de doença respiratória aguda ao contactarem com o vírus selvagem. A explicação para esta reacção adversa à vacina continua a ser um enigma. No entanto, parece relacionar-se com um desvio da imunidade, induzido pela vacina, para os mecanismos Th2, conforme descrito anteriormente (Hacking 2006, Bennett 2007).

A investigação sobre o VSR tem avançado significativamente nas últimas décadas, (Garofalo 2005, Chaves-Bueno 2006). Persistem diversas questões que, ao serem resolvidas, permitiriam avanços importantes: Qual é o receptor celular do vírus? Onde se pode alterar o processo de replicação vírica? Como aumentar a eficácia da resposta

imune do hospedeiro? Qual a vulnerabilidade do sistema imunitário ou o estratagema vírico que torna possível a reinfeção? As respostas a estas questões podem conduzir ao desenvolvimento de tratamentos ou mesmo de uma vacina.

Vírus Parainfluenza (VPI)

Pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirus* (a mesma dos vírus da parotidite e do sarampo) e género *Paramyxovirus* (Weinberg 2006).

A sua estrutura encontra-se representada esquematicamente na figura 10. Tem uma cadeia única de ARN, associada a uma nucleoproteína (NP). O envelope vírico é constituído por uma membrana bilipídica proveniente do hospedeiro, onde se fixam as glicoproteínas G, H, N e F, responsáveis pela adesão e fusão vírica (Weinberg 2006).

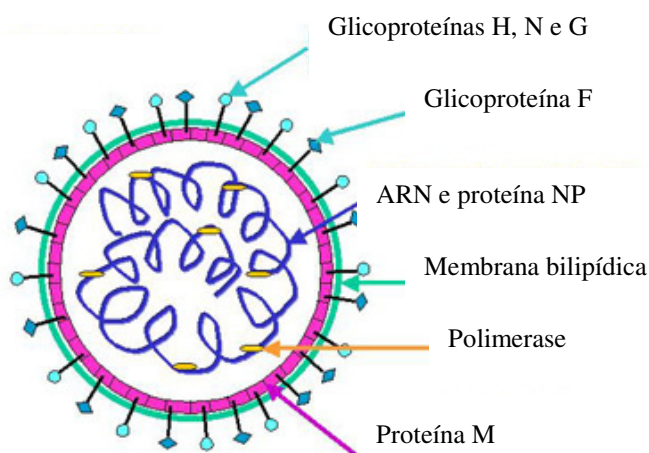


Figura 10: Representação esquemática da estrutura do VPI (adaptado de Murray 2005).

A patogénese do VPI inicia-se pela ligação aos receptores, seguida da fusão com a membrana celular e libertação do ARN para o citoplasma. Pela acção da polimerase, obtém-se novas cadeias de ARN vírico que se reúne com um fragmento de membrana celular antes da libertação vírus maduros (Weinberg 2006, Murray 2005).

A infecção ocorre em epidemias ou de forma esporádica. A transmissão ocorre por via aérea, contacto íntimo, aerossóis ou fómites contendo partículas respiratórias infectadas (Red Book 2006). O período de incubação é de 2 a 6 dias.

A apresentação clínica da infecção por VPI inclui coriza, otite, laringotraqueobronquite, bronquiolite e pneumonia. É o segundo agente mais frequente de infecção respiratória baixa em lactentes e crianças pequenas (Long, 2002).

O Ag vírico detecta-se por radioimunoensaio ou imunofluorescência nas secreções nasais. O diagnóstico serológico é tardio e inútil na prática clínica (Red Book 2006).

A imunidade após a infecção é transitória. O tratamento é sintomático e de suporte (Long 2002, Weinberg 2006, Murray 2005).

A prevenção da transmissão é difícil pois a eliminação de VPI é prolongada e assintomática sendo, além disso, um vírus resistente que persiste horas em superfícies lisas. A lavagem de mãos e de superfícies contribui para limitar a transmissão em contexto hospitalar ou em infantários (Long 2002, Red Book 2006).

Vírus Influenza

O Vírus Influenza (VI) pertence à família *Orthomyxovirus* e ao Género *Influenzavirus*. Existem três tipos (A, B e C). É um vírus pleomórfico, de genoma ARN de cadeia única helicoidal, cuja estrutura se esquematiza na figura 11 (Murray 2005, Cheung 2007).

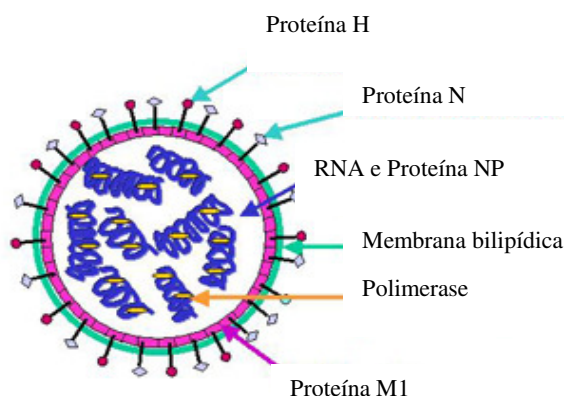


Figura 11: Representação do Vírus Influenza (baseado em Murray, 2005)

As proteínas M1 e NP caracterizam o tipo de vírus (A, B ou C). Os Ag externos (H e N) são mais variáveis e específicos de subtipo e estirpe (Long 2002, Cheung 2007).

O VI infecta e destrói as células epiteliais respiratórias. As células T citotóxicas produzem interferão α e β com o objectivo de combater o vírus. Estas substâncias são responsáveis por febre, mal-estar, fadiga e mialgias (Garofalo 2005, Cheung 2007).

A infecção por VI ocorre em epidemias anuais. As estirpes são classificadas pelos Ag H e N. Predominam, na infecção humana, os Ag H1, H2, H3, N1 e N2 (Murray 2005).

Devido a pequenas mutações (*drifts*) que ocorrem nos Ag H e N, surgem, todos os anos, novas variantes de VI. Fora dos grupos de risco, a gripe evolui favoravelmente, pois existe alguma imunidade parcial prévia. De dez em dez anos, ocorrem mutações *major* (*shifts*), surgindo estirpes “novas” muito virulentas para a espécie humana, pela inexistência de imunidade prévia. Estes vírus “novos” são responsáveis por pandemias graves como a que ocorreu em 1918. A estirpe aviária H5N1 é muito agressiva para os seres humanos mas, por enquanto, é pouco virulenta (Cheung 2007).

O VI transmite-se de pessoa a pessoa através de partículas em aerossol. O período de incubação é de 18 a 72 horas.

Como manifestações clínicas são de salientar: febre, mialgias, cefaleias, fotofobia, tosse seca e rinorreia. Pode surgir miosite, miocardite e encefalopatia. As complicações pulmonares determinam a mortalidade e as sequelas da doença. (Long 2002).

Existem diversos fármacos antivíricos eficazes. A rimantadina e a amantadina bloqueiam a libertação de ARN vírico. O oseltamivir e o zanamivir inibem a neuraminidase. São usados em profilaxia e tratamento (Red Book 2006).

A prevenção eficaz é possível pela vacinação. A partir de dados provenientes da monitorização mundial, é comercializada uma vacina anual, dirigida contra as estirpes previsivelmente dominantes. A vacina é multivalente, incluindo estirpes de VI-A e VI-B, e deve ser administrada, nos meses de Outono, aos doentes crónicos, idosos e pessoal de saúde (Red Book 2006).

Adenovírus

Este vírus pertence à família *Adenoviridae* e ao género *Mastadenovirus*. No *core* central situam-se a cadeia linear dupla de ADN e as proteínas responsáveis pela replicação. A cápside é constituída por 252 proteínas dispostas de forma icosaédrica. Em cada vértice localiza-se a proteína IV. Na figura 12 está representada a estrutura do Adenovírus (Murray 2005).

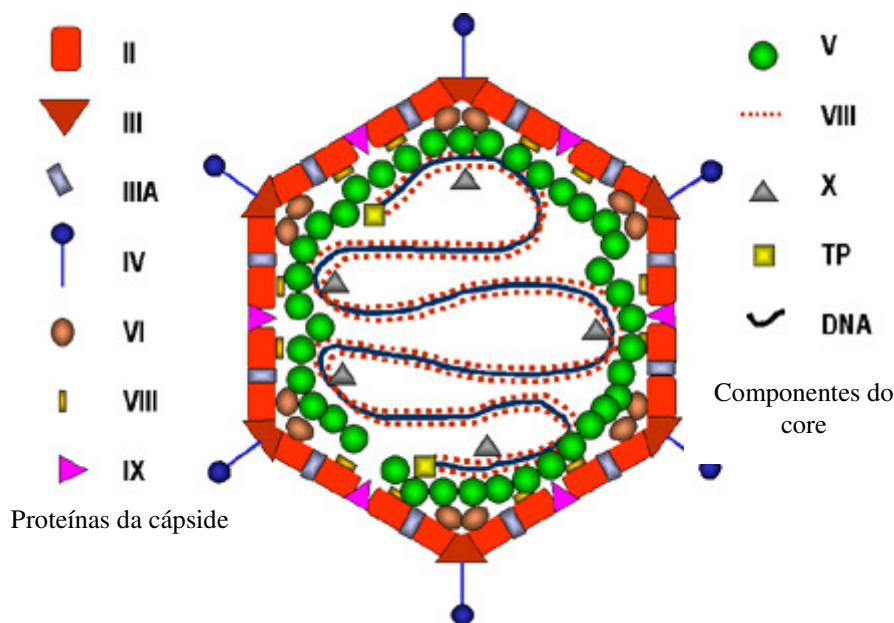


Figura 12: Representação esquemática do Adenovírus (Murray, 2005).

O Adenovírus infecta células de diferentes tecidos epiteliais (conjuntival, respiratório, gastrointestinal ou genitourinário). A proteína IV adere aos receptores de superfície, sendo o vírus incorporado por endocitose. A multiplicação ocorre no citoplasma e núcleo. Após reunir as suas partículas e se libertar, o vírus provoca lise celular (Murray 2005). Este agente pode permanecer latente no tecido linfóide, podendo ocorrer disseminação hematogénica (Long 2002). A capacidade que o Adenovírus tem de interferir com processos nucleares em diversos tipos de célula tem permitido a sua utilização como vector na investigação de terapias genéticas (Murray 2005).

O período de incubação varia entre 2 e 14 dias (Long 2002). A doença respiratória (serotipos 1 a 7 e 21) pode cursar com coriza, amigdalite, laringite, pneumonia, bronquiolite ou pneumonia grave que pode originar sequelas de bronquiolite obliterante. Outros serotipos causam doenças oculares, gastrointestinais, genitourinárias, do sistema nervoso ou cardíacas (Murray 2005).

A forma de transmissão varia com os serotipos: contacto directo, oral-fecal ou a partir de águas contaminadas. A infecção é comum, entre nós, de Fevereiro a Junho (Red Book 2006).

O diagnóstico inclui a detecção de Ag por imunofluorescência, ELISA, PCR, isolamento vírico e serologia. O isolamento pode não corresponder a infecção aguda. A serologia confirma o diagnóstico ao fim de algumas semanas, o que pode ser útil no esclarecimento de sequelas pulmonares ou em estudos epidemiológicos.

O Adenovírus é altamente resistente a agentes físicos ou químicos, sobrevivendo por períodos prolongados fora do hospedeiro. Na prevenção da transmissão é, assim,

fundamental cumprir todas as práticas de controlo de infecção (Red Book 2006). Não existe vacina.

O tratamento desta infecção é sintomático.

Metapneumovírus Humano

Pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e género *Metapneumovirus*. É um vírus ARN, relacionado com o VSR, identificado como agente patogénico em 2001. O seu papel na etiologia de infecções das vias aéreas superiores e inferiores tem sido reconhecido em todo o mundo, nomeadamente como causa de 4 a 16% das bronquiolites (Laham 2004). Mais de 70% das crianças torna-se seropositiva até aos cinco anos. Causa epidemias nos meses de Inverno. Existem dois tipos e, dentro de cada, dois subtipos. É detectado por PCR ou serologia (Laham 2004, Deffrasnes 2007).

Rinovírus

Integra a família *Picornaviridae*. É um vírus ARN de cadeia única, não capsulado. É o agente principal da rinofaringite comum, podendo causar bronquiolite, exacerbações de asma e agudização de sibilância recorrente. Existem mais de cem serotipos, o que dificulta a produção de vacinas. Transmite-se por aerossol ou através de pequenas gotículas ou contacto directo. Lesa o epitélio respiratório, não ocasionando virémia. A sua identificação, complexa e não disponível na prática clínica, necessita de isolamento em cultura de células humanas do epitélio nasal (Murray 2005).

MECANISMOS VIRAIS DE EVICÇÃO DO SISTEMA IMUNE

A fim de assegurar a continuação do seu ciclo de vida, os agentes infectantes desenvolveram formas de evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro. O conhecimento desses mecanismos e dos diferentes aspectos da relação dos vírus com as células humanas é fundamental para o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas (Hacking 2002, Lindemans 2005, Becker 2006).

A entrada dos vírus na célula constitui o primeiro obstáculo, uma vez que a membrana das células epiteliais é impermeável a macromoléculas. Como tal, os vírus desenvolveram mecanismos de adesão aos receptores celulares, mimetizando, com frequência, substâncias normais do organismo, a fim de não serem identificados como estranhos. O Rinovírus, por exemplo, liga-se aos receptores de lipoproteínas de baixa densidade, o VI ao ácido neuramínico (Cheung 2007) e o VPI ao ácido siálico (Hall 2001). No caso do VSR, o receptor celular ainda não foi identificado em definitivo (Hacking 2002, Lindemans 2005, Becker 2006).

Após a adesão e entrada na célula, no caso do VSR, é induzida a formação de sincícios entre as células do epitélio respiratório, sistema pelo qual as partículas virais conseguem protelar, por um período prolongado, a detecção por parte do sistema imunitário. O VSR induz enzimaticamente, por acção da proteína F, a fusão entre as paredes celulares e a desorganização do citosqueleto (Boelen 2003, Garofalo 2004, Ogra 2004, Openshaw 2005, Lindemans 2005, Pinto 2006).

Os diferentes vírus respiratórios desenvolveram igualmente a capacidade de contrariar a acção do interferão. O Adenovírus consegue, pela proteína V, inibir directamente a transcrição dos genes celulares responsáveis pela síntese de interferão α , β e γ . Assim, a acção antivírica destas proteínas é inibida, não se desencadeando a citotoxicidade directa das células *natural killer* e dos linfócitos CD8. O VPI, pela acção de uma proteína V análoga, inibe a sinalização do interferão, bloqueando, de forma indirecta, a respectiva acção (Weinberg 2006). O VSR, como não dispõe de proteína V, terá outros mecanismos acessórios com função análoga, provavelmente pela acção das proteínas NS1 e NS2 (Bont 2002, Spann 2004, Bitko 2004, Schauer 2004, McNamara 2004, Copenhaver 2004, Braciale 2005, Lindemans 2005, Chaves-Bueno 2006, Culley 2006, Bennett 2007).

Alguns vírus, como VSR, Metapneumovírus humano e Adenovírus inibem directamente numerosas enzimas com acção antivírica (Laham 2004, Williams 2004, Lewis 2006, Melendi 2007, Deffrasnes 2007).

A apoptose das células infectadas permite circunscrever uma infecção, eliminando os agentes intracelulares, sem lesão do tecido circundante. Os vírus respiratórios desenvolveram mecanismos de inibição da apoptose, o que lhes permite permanecer vivos por períodos mais prolongados e transmitir a infecção a outras células (Lindemans 2005).

O conhecimento dos mecanismos que os agentes virais desenvolveram com o objectivo de contrariar as defesas do hospedeiro poderá, em suma, contribuir para o desenvolvimento de novas formas de prevenção e tratamento destas infecções e das suas sequelas (Lindemans 2005).

SIBILÂNCIA RECORRENTE

CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO

A sibilância (do latim *sibilare*) ou pieira (do latim *pipilare* – piar) é um som torácico de elevada frequência acústica que traduz diminuição patológica do calibre das pequenas vias aéreas - brônquios secundários, terciários e bronquíolos (Leiria 2003). É um sinal predominantemente expiratório, uma vez que o fluxo de ar nessa fase do ciclo respiratório é passivo, tornando a obstrução mais evidente.

De acordo com Leiria (2003), a sibilância recorrente (três ou mais episódios no período de um ano) tem o mesmo significado clínico da sibilância persistente (aquela que se arrasta por mais de quatro semanas). Estas síndromas podem associar-se a causas intraluminais (corpo estranho, broncospasmo, edema da mucosa, acumulação de secreções) ou extraluminais (tumor, anomalia vascular, adenopatia).

Na anamnese é fundamental distinguir sibilância de outros ruídos respiratórios (estridor, pigarro faríngeo ou ruídos de origem nasal), após o que se deve identificar o padrão e a gravidade dos sintomas. São dados importantes: a idade de início das queixas (quando mais precoce, maior a probabilidade de doença congénita); o tipo de início da doença (súbito ou gradual); a existência de períodos assintomáticos; os factores desencadeantes (infecções das vias aéreas superiores, contacto de alérgenos ou poluentes, mudanças de posição, refeições, engasgamento, esforço, riso, condições climáticas); os sintomas acompanhantes (regurgitação, vômitos, rinorreia, roncopatia, apneia do sono, diarreia, má progressão ponderal, entre outros); os antecedentes pessoais de prematuridade, ventilação mecânica, atopia ou infecções recorrentes. A história familiar de doenças respiratórias, o consumo de tabaco e as condições sócio-económicas podem ser relevantes para o esclarecimento da situação. O contexto epidemiológico e a frequência de infantário podem também ser dados importantes.

Ao exame físico, deve ser avaliada a repercussão da doença sobre o estado geral, o grau de nutrição e hidratação e a presença de sinais de dificuldade respiratória. A existência de anomalias associadas, hipocratismo digital, pólipos nasais, deformidades torácicas ou alterações cardíacas podem ser importantes para o diagnóstico. A auscultação pulmonar pode detectar fervores ou sibilos localizados, assimetria do murmúrio vesicular, estridor, ou outras situações que necessitem de investigação mais aprofundada.

As causas de sibilância recorrente ou persistente são numerosas, conforme se discrimina no quadro 1 (Leiria 2003, Taussig 2008).

Até ao primeiro ano de vida, 20 a 40% dos lactentes têm mais de um episódio de sibilância. A entidade “pieira transitória do lactente” causa 80% destes casos, sendo associada a infecção por vírus respiratórios e às suas sequelas. As outras patologias referidas no quadro 1 justificam os restantes 20%.

Se a primeira crise surge após o primeiro aniversário, ganham peso as outras causas, principalmente a asma. No entanto, a sibilância transitória do lactente continua, até aos 36 meses, a ser causa de 60% dos casos de sibilância (Lemanske 2002, Stokes-Peebles 2004, Arora 2006, Ly 2006, Panickar 2006, Epton 2007, Bush 2007, Lee 2007).

Quadro 1: Patologias associadas a sibilância recorrente ou persistente no lactente.

PATOLOGIA EXTRALUMINAL	Tumor pulmonar
	Edema pulmonar
	Sequestro pulmonar
	Quisto broncogénico
	Enfisema lobar congénito
	Pneumonia
	Cardiomegalia
	Anel vascular
	Vaso aberrante
	Adenomegalias
	Tuberculose
	Linfoma
	Metástase
	Tumor mediastínico
	Escoliose
	Deformação torácica
PATOLOGIA TRANSLUMINAL	Asma
	Sibilância transitória do lactente
	Bronquiectasias
	Fibrose quística
	Disfunção ciliar
	Displasia broncopulmonar
	Défice imunitário
	IgA, IgG, subclasses
	Imunodeficiência celular ou combinada grave
	Infecção
	Larva migrans visceral
	Aspergilose broncopulmonar alérgica
	Défice de $\alpha 1$ antitripsina
	Pneumonia de hipersensibilidade extrínseca
	Bronquiolite obliterante
PATOLOGIA ENDOLUMINAL	Anomalia traqueal ou brônquica
	Malácia
	Estenose
	Quisto
	Corpo estranho
	Refluxo gastroesofágico
	Outras síndromas aspirativas
	Alteração do sistema nervoso central
	Fístula traqueoesofágica
	Fenda palatina
	Incoordenação da deglutição
	Síndrome adenosinobrônquico
	Massa endoluminal
	Pólipo
	Hemangioma
PATOLOGIA NEUROMUSCULAR	Granuloma
	Tumor
	Hemossiderose
	Edema pulmonar (insuficiência cardíaca congestiva)
	Neuropatias
	Miopatias
	Escoliose

A gravidade das patologias crónicas com sibilância pode ser classificada conforme os critérios internacionais desenvolvidos para a asma brônquica (GINA 2006).

A classificação orienta-se pela frequência dos sintomas e o grau de obstrução das vias aéreas ao fluxo de ar expiratório. Classicamente, classificam-se os doentes em quatro categorias: intermitente, persistente ligeira, persistente moderada ou persistente grave, (quadro 2). Abaixo dos cinco anos, pela dificuldade em determinar o fluxo expiratório máximo no primeiro segundo (FEV₁), a avaliação é apenas clínica (Nielsen 2006).

Quadro 2: Classificação das síndromas sibilantes do lactente pela frequência e intensidade dos sintomas (adaptado de GINA 2006).

	Sintomas diurnos	Sintomas noturnos	Varição de FEV ₁
Intermitente	< 1 vez semana	≤ 2 vezes/mês	Não se aplica abaixo dos 5 anos
Ligeira persistente	1vez/dia a 1vez/semana	> 2 vezes/mês	
Persistente moderada	Diários	> 1 vez/semana	
Persistente severa	Contínuos Actividade física limitada	Frequentes	

As normas mais recentes associam a gravidade da doença (que pode variar ao longo do tempo) à resposta ao tratamento (quadro 3) (Bush 2007).

Quadro 3: Classificação das síndromas sibilantes do lactente conforme o nível de controlo sintomatológico obtido (adaptado de GINA 2006 e PRACTALL 2008).

CARACTERÍSTICA	CONTROLADA (Todos os seguintes)	PARCIALMENTE CONTROLADA (Qualquer das seguintes)	NÃO CONTROLADA
Sintomas diurnos	≤ 2 vezes/semana	> 2 vezes/semana	Três ou mais dos critérios de “Parcialmente controlada”
Limitação de actividade	Nenhuma	Qualquer	
Sintomas noturnos	Nenhum	Qualquer	
Necessidade de terapêutica de crise	≤ 2 vezes/semana	> 2 vezes/semana	
Exacerbações	Nenhuma	Uma ou mais por ano	

EXAMES COMPLEMENTARES DE DIAGNÓSTICO

A *sibilância transitória do lactente* é um diagnóstico de exclusão, após estudos bioquímicos, imunológicos, alergológicos, imagiológicos, genéticos, funcionais respiratórios ou broncoscópicos, adequados às hipóteses diagnósticas de cada doente. No quadro 4 enumeram-se alguns exames a considerar na investigação etiológica da sibilância recorrente ou persistente na primeira infância (Leiria 2003).

Quadro 4: Exames complementares necessários na investigação da sibilância recorrente da infância.

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA	EXAMES COMPLEMENTARES
Doença das vias aéreas superiores	Radiografia do cavum e seios perinasais
	IgE total e Teste multialérgico
	Endoscopia nasal
	Tomografia computadorizada
	Polissomnografia
Alteração da deglutição	Videofluoroscopia
	Avaliação por terapeuta da fala
Doença esofágica	pHmetria
	Endoscopia
	Ecografia abdominal com pesquisa de refluxo gastroesofágico
	Trânsito esofágico
Fibrose quística	Prova de suor
	Estudo genético
	Elastase fecal
	Esteatócrito fecal
Discinesia ciliar primária	Estudo de microscopia electrónica
	Estudo genético
Imunodeficiência	Imunoglobulinas e subclasses
	Anticorpos vacinais
	Populações linfocitárias
	Estudos de função dos neutrófilos
	Serologia para Vírus da Imunodeficiência Humana 1 e 2
Anomalia estrutural vias aéreas	Broncofibroscopia
Tuberculose	Intradermoreacção de Mantoux
	Pesquisas de bacilo de Koch
	Radiografia do tórax
Doença cardíaca ou vascular	Ecocardiograma
	Trânsito esofágico
	Angiografia
	Angiorressonância magnética nuclear
Patologia mediastínica	Ressonância magnética nuclear
Bronquiectasias	Tomografia axial computadorizada de alta resolução
Asma brônquica	IgE total e específicas
	Testes cutâneos
	Espirometria com testes de provocação e broncodilatação
	Provas funcionais respiratórias
	Medição de NO exalado

TERAPÊUTICA

A terapêutica de fundo da asma brônquica baseia-se em orientações internacionais (quadro 5). Nas situações de sibilância em crianças com idade inferior a 3 anos, privilegia-se o uso de modificadores dos leucotrienos e corticosteróides inalados (GINA 2006). Recentemente, o consenso PRACTALL (Bacharier 2008), veio legitimar a aplicação da maioria destes procedimentos aos doentes com idade inferior a 5 anos.

Quadro 5: Terapêutica de fundo na sibilância recorrente do lactente (adaptado de GINA 2006 e PRACTALL 2008).

NÍVEL 1	NÍVEL 2	NÍVEL 3	NÍVEL 4	NÍVEL 5
Educação e controle ambiental				
β2 agonistas de curta acção				
	Seleccionar 1	Seleccionar 1	Seleccionar 1	Juntar ao anterior
	Corticóides inalados (CI) de baixa dose OU Modificadores dos leucotrienos	CI de média ou alta dose OU CI de baixa dose + Modificadores dos leucotrienos	CI de média ou alta dose + Modificadores dos leucotrienos	Corticóide oral

Como súmula dos mecanismos descritos anteriormente, são numerosos os factores de susceptibilidade individual e os factores ambientais que contribuem para a evolução das doenças sibilantes da infância. Da revisão da literatura, admitimos que as infec  es virais participem na evolução destas situa  es, essencialmente através da modula  o da susceptibilidade prévia, conforme se encontra esquematizado na figura 13.

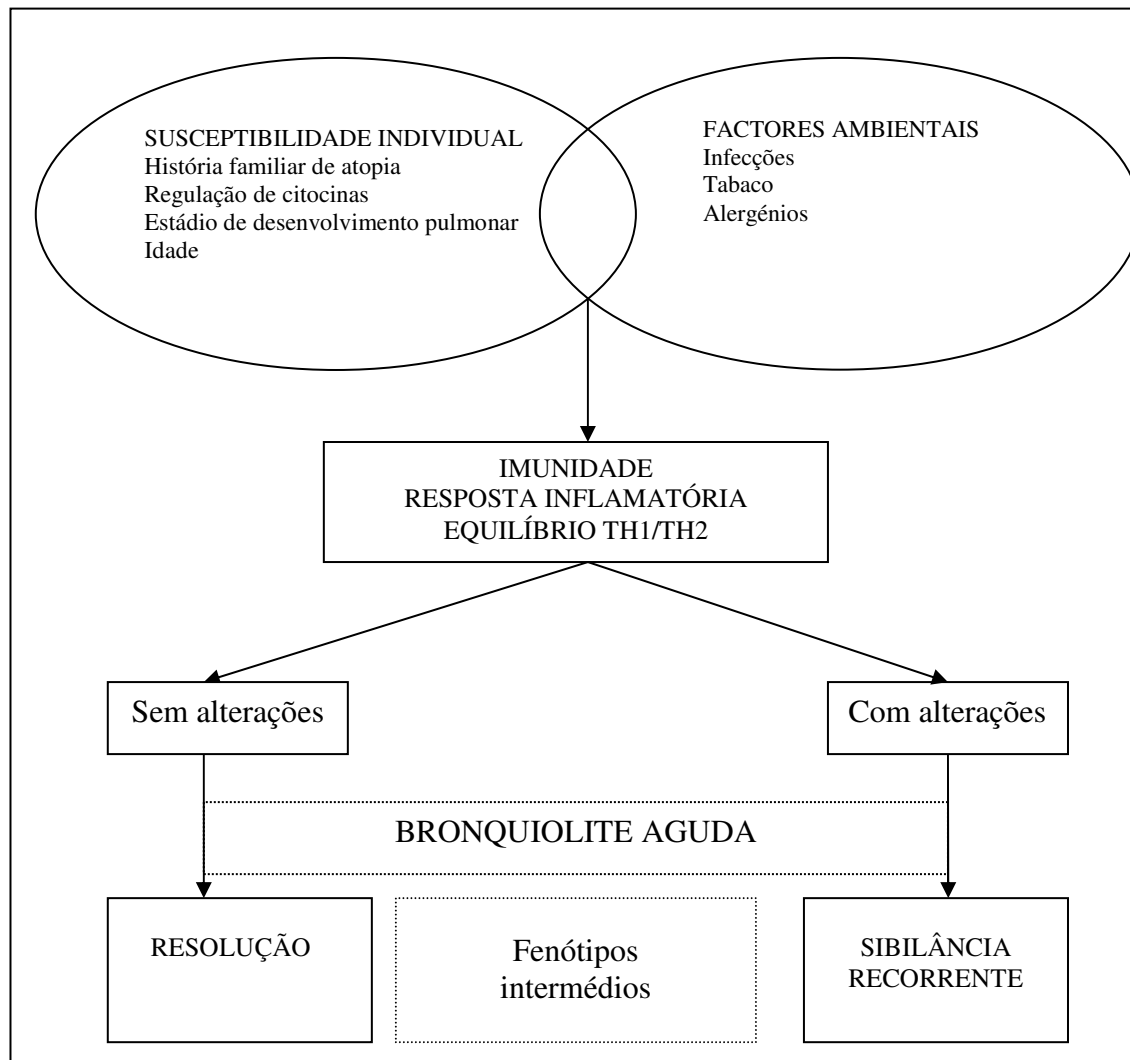


Figura 13: Influência de diversos factores no aparecimento e na evolução das doenças sibilantes da infância (Adaptado de Bracken 2005 e Singh 2007)

INVESTIGAÇÃO REALIZADA

OBJECTIVOS

Os objectivos deste estudo foram:

1. Identificar factores de risco de ocorrência de sibilância recorrente após um primeiro episódio de bronquiolite
2. Estudar o comportamento, no decorrer de uma primeira bronquiolite, de algumas citocinas implicadas na imunidade e inflamação das vias aéreas (nomeadamente as que participam em respostas imunes de tipo Th1 ou Th2) e relacioná-lo com a evolução clínica subsequente

PLANO GERAL DO ESTUDO

O estudo iniciou-se com o recrutamento de um grupo de lactentes previamente saudáveis, na data de um primeiro episódio de bronquiolite aguda, e prosseguiu com o seu acompanhamento durante a primeira infância.

No episódio inicial foi recolhida informação sobre dados demográficos, epidemiológicos e clínicos e atribuído um índice de gravidade. Foram efectuados estudos virológicos a nível das vias aéreas superiores. Em simultâneo, foram colhidas secreções nasais para avaliar o comportamento da imunidade nasal, nomeadamente nos aspectos respeitantes ao paradigma Th1/Th2. Nesse material, foi determinada a expressão génica de quatro citocinas (duas representativas de cada via).

As crianças foram acompanhadas em consulta de pneumologia infantil até ao terceiro aniversário. O seguimento foi clinicamente adaptado a cada doente, de acordo com as boas práticas médicas. Durante esse período, foram excluídas do estudo todas as crianças em que foi identificada uma causa anatómica, orgânica ou funcional de sibilância recorrente (ver quadro 1).

No final do período de seguimento os doentes foram classificados como “sibilantes” ou “não sibilantes”, de acordo a definição apresentada.

De seguida, foi feito o estudo estatístico de todas as variáveis, com as seguintes fases:

1. Estatística descritiva, para conhecimento adequado da amostra.
2. Estudo univariado do comportamento dos diversos parâmetros em relação à variável *sibilante / não sibilante*, no sentido de identificar eventuais factores de risco
3. Estudo univariado do comportamento das diversas citocinas, para registo das relações estatísticas existentes com as restantes variáveis
4. Modelo multivariados para definição dos factores de risco para evolução para sibilância recorrente
5. Modelo multivariado para esclarecimento da relação entre o predomínio Th1 ou Th2 e os vários parâmetros clínicos.

TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo prospectivo de coorte.

Os dados clínicos foram recolhidos pelo preenchimento de um questionário visando obter a informação relativa à amostra estudada (Chong-Neto 2007).

O estudo virológico consistiu na determinação dos respectivos Ag nas secreções nasais durante o episódio inicial.

A expressão dos genes das citocinas nasais foi determinada por métodos de biologia molecular.

Foi efectuado o seguimento clínico trimestral das crianças em consulta de pneumologia infantil até todas completarem três anos de idade.

Os dados foram introduzidos, ao longo do tempo de duração do estudo, numa base de dados informática.

No final do seguimento, foram pesquisadas estatisticamente, por metodologias descritivas e modelos uni- e multivariados, os parâmetros que se relacionaram com os diferentes padrões de evolução clínica.

MATERIAL E MÉTODOS

DOENTES ESTUDADOS

Os doentes que integram o estudo provieram do serviço de urgência pediátrica do Hospital de São Francisco Xavier (HSFX) – Director: Dr José Carlos Guimarães.

Este hospital, integrado no Serviço Nacional de Saúde de Portugal, presta cuidados a uma população aproximada de 400.000 indivíduos residentes no concelho de Oeiras e em cinco freguesias da zona ocidental da cidade de Lisboa. A população que recorre ao serviço de urgência pediátrica é muito heterogénea do ponto de vista sócio-económico.

Os doentes foram recrutados a partir de uma amostra de conveniência obtida entre os lactentes com idade inferior a 24 meses, que recorreram ao serviço de urgência pediátrica do HSFX, com o diagnóstico de bronquiolite aguda, com sintomatologia respiratória com duração inferior a uma semana.

O recrutamento dos doentes decorreu entre 11 de Outubro de 2004 e 24 de Abril de 2005, período em que, no serviço de urgência do HSFX, foram observadas 21.241 crianças.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas:

1. Todas as crianças com doenças crónicas subjacentes, de acordo com a definição considerada: doenças respiratórias, cardíacas, imunológicas, neuromusculares ou gastrointestinais.
2. Lactentes nascidos com idade gestacional inferior a 32 semanas e / ou peso ao nascer inferior a 1500 g.
3. Lactentes submetidos, nas duas semanas anteriores, a terapêutica com corticosteróides inalatórios ou sistémicos.

QUESTIONÁRIOS

No episódio inicial, e no momento da admissão, foi efectuado um questionário ao adulto acompanhante de cada doente, a fim de recolher dados epidemiológicos, demográficos e clínicos (Anexo 1).

A recolha dos dados foi efectuada pelo investigador principal ou por um dos médicos participantes na equipa de investigação (oito médicos internos do internato complementar de pediatria integrados em diferentes equipas de urgência). Os critérios de preenchimento do questionário foram previamente estabelecidos em reunião da equipa. No decorrer do estudo, ocorreram reuniões com periodicidade mensal, a fim de monitorizar a uniformidade dos critérios seguidos e o rigor dos registos.

TRATAMENTO DO EPISÓDIO INICIAL

Os doentes foram tratados, no episódio inicial, em internamento ou em ambulatório, de acordo com os critérios clínicos definidos nos protocolos do serviço (Anexo 2).

DEFINIÇÕES

Para melhor compreensão do texto foram estabelecidas as seguintes definições, relativamente a alguma terminologia utilizada.

Aleitamento materno: alimentação exclusiva de leite materno até, pelo menos, aos 3 meses de idade.

Antecedentes pessoais de atopia: diagnóstico médico prévio de eczema atópico ou alergia alimentar.

Asma: doença caracterizada por tosse, pieira e dispneia, que evolui por crises reversíveis e na qual se demonstra sensibilização atópica. Do ponto de vista fisiopatológico há obrigatoriamente hiperreactividade brônquica com edema, acumulação de secreções e broncospasmo por contracção do tecido muscular liso dos brônquios (Leiria 2003).

Atopia familiar: diagnóstico médico prévio de asma, rinite, eczema atópico feito aos familiares directos – mãe, pai e irmãos.

Bronquiolite: doença respiratória aguda, própria dos lactentes e crianças pequenas, que cursa com coriza e ocasionalmente febre, e evolui, nalguns dias, para um quadro de tosse, taquipneia, hiperinsuflação torácica e dificuldade respiratória. À auscultação pulmonar detecta-se a presença de roncos, sibilos ou fervores dispersos e bilaterais (Leiria 2003).

Citocinas: Grupo de proteínas solúveis, produzidas por diversas populações celulares, cujo papel consiste em regular as funções celulares e mediar a transmissão de informação entre as células, nomeadamente os leucócitos e as células epiteliais. Intervêm em quase todas as reacções inflamatórias e imunitárias, nomeadamente na apresentação de antigénio, diferenciação, recrutamento e activação das diversas linhas celulares e nas respostas de fase aguda. Algumas citocinas têm actividade local, outras actuam à distância, sendo libertadas na circulação sanguínea.

Doença crónica: alteração física de evolução arrastada (com duração habitualmente superior a um mês) cuja gravidade interfere com as actividades normais da criança.

Exposição pré-natal a tabaco: consumo diário de tabaco pela mãe durante a gravidez, independente da quantidade.

Expressão génica: No processo da síntese proteica é sabido que a informação primordial reside no ADN do núcleo e é transmitida ao ARNm. Este, por sua vez, a nível dos ribossomas, possibilita a reunião sequencial de aminoácidos, de acordo com a sequência de nucleótidos determinada pelo código genético. O conjunto deste processo designa-se de expressão génica. Em lugar de dosear uma determinada citocina, que apresenta baixa estabilidade e semivida curta, é habitualmente recomendado o doseamento do respectivo ARNm, processo laboratorial utilizado nesta investigação.

Febre: referência, pelos acompanhantes, no momento da admissão de temperatura axilar igual ou superior a 37,5°C ou temperatura rectal ou timpânica igual ou superior a 38°C.

Frequência diária de espaços comuns: enquadra-se, nesta definição, a frequência de locais como creches, infantários, berçários ou amas durante cinco ou mais horas diárias em pelo menos cinco dias de cada semana, na companhia de um número de crianças igual ou superior a cinco.

Odds ratio: cálculo aproximativo do risco relativo de um determinado parâmetro em modelos uni- ou multivariados. Transmite a ideia da probabilidade associada a esse factor, devendo ser apresentado em conjunto com o respectivo intervalo de confiança (a

95%, no caso desta investigação). *Odds ratio* tem significado estatístico sempre que “1” esteja fora desse intervalo. Valores de *odds ratio* superiores a 1 definiram, neste estudo, um determinado parâmetro como constituindo um factor de risco, enquanto valores inferiores a 1 apontam no sentido de se tratar de um factor protector em relação ao efeito estudado.

Phadiatop: Teste multialergénio comercial que mede a reacção sérica a painéis de diferentes alergénios pré-estabelecidos de tipo inalatório ou alimentar (Lau 2008).

RT-PCR - Reacção em Cadeia de Polimerase em Tempo Real: Técnica laboratorial de Biologia Molecular baseada na amplificação e quantificação simultânea de uma dada sequência de ADN. Essa molécula pode ser obtida por transcrição reversa a partir de ARNm, sendo amplificada de forma sequencial. A quantificação final é obtida por medição da fluorescência emitida pela reacção e subsequente comparação com uma sequência de ADN previamente conhecida.

Semana epidémica: sistema de contagem das semanas de cada ano, considerando como semana nº1 aquela que inclui a primeira quinta-feira de Janeiro. Este sistema, criado pelo Centers for Disease Control and Prevention e pela Organização Mundial de Saúde é usado para datação e monitorização da evolução do curso de epidemias.

Sensibilização atópica: demonstração, num determinado indivíduo, de fenómenos de hiperreactividade através de reacções de hipersensibilidade imediata, mediada por IgE. Essa demonstração pode ser feita por testes de picada ou pelos níveis séricos de IgE específica (Rosado-Pinto 2005).

Sibilância ou pieira recorrente: três ou mais episódios agudos, ocorrendo num período de um ano, com tosse, taquipneia, hiperinsuflação torácica ou dificuldade respiratória.

Tabagismo passivo: referência, pelo acompanhante da criança, de consumo de tabaco por algum coabitante, independentemente da quantidade ou tipo de tabaco consumido.

VARIÁVEIS ESTUDADAS

Variáveis clínicas

1. Data da primeira bronquiolite (conforme divisão em semanas epidémicas)
2. Idade do doente (em dias)
3. Sexo (masculino ou feminino)
4. Raça (branca ou outra)
5. Escolaridade dos pais (em ano lectivo frequentado pelo pai e pela mãe)
6. Número de coabitantes (número de indivíduos que pernoitassem, habitualmente, na mesma habitação da criança)
7. Idade da mãe (em anos)
8. Número de irmãos
9. Tabagismo passivo (definido pela referência, pelo acompanhante da criança, de consumo de tabaco por algum coabitante, independentemente da quantidade ou tipo de tabaco consumido)
10. Antecedentes familiares de atopia (diagnóstico médico de rinite, asma ou alergia alimentar na mãe, pai ou irmãos)
11. Idade gestacional (em semanas, conforme registo constante do Boletim de Saúde Infantil e Juvenil)
12. Peso ao nascer (em gramas conforme registo constante do Boletim de Saúde Infantil e Juvenil)
13. Exposição pré-natal a fumo de tabaco (considerado se houvesse referência a consumo habitual de tabaco pela mãe durante a gravidez, independentemente da duração, tipo ou quantidade consumida diariamente)
14. Aleitamento materno (considerado quando exclusivo até, pelo menos, aos 3 meses de idade)
15. Frequência diurna de espaços comuns (creches, infantários ou amas com mais de seis crianças). Este dado foi registado nas crianças com idade superior a 120 dias, de acordo com a legislação de apoio à maternidade em vigor. Esta variável, conjugada com a variável “8) existência e número de irmãos”, permitiu criar uma outra variável, designada como
16. Convívio diário com outras crianças

17. Contacto diário com animais domésticos (coabitação habitual da criança com cães, gatos ou aves)
18. Tipo de aquecimento doméstico (residência habitual com equipamento de aquecimento tipo eléctrico ou a gás e/ou lareira com ou sem protecção)
19. Antecedentes pessoais de atopia (diagnóstico médico de rinite alérgica, eczema atópico ou alergia alimentar)
20. Peso actual, em gramas, de acordo com pesagem efectuada no Serviço de Urgência Pediátrica do HSFX, em balança electrónica modelo 727 da marca Seca®)
21. Presença de febre no episódio de admissão (considerada quando havia referência a medição de febre no domicílio ou no hospital. A temperatura timpânica foi avaliada a todas as crianças, na observação inicial, por um termómetro digital Genius First Temp®, da Sherwood Medical).
22. Índice de gravidade, de acordo com os critérios estabelecidos no quadro 6. O episódio inicial de sibilância foi classificado com valores entre 0 e 18, pelos dados clínicos observados (estado geral, cor da pele, frequência respiratória, presença e intensidade de tiragem, sibilos e valor da saturação transcutânea da hemoglobina em oxigénio - SpO₂ (Criticare System®, modelo 504 DX):

Quadro 6: índice de gravidade da bronquiolite aguda (adaptado de Wang 1992).

PONTUAÇÃO	0	1	2	3
Frequência respiratória (cpm)	<30	31-45	46-60	>60
Tiragem	Ausente	Infracostal	Supraesternal e intercostal	Global + Adejo Apneia
Auscultação pulmonar	Normal	Sibilos na expiração	Sibilos nos dois tempos	Murmúrio vesicular diminuído / ausente
Estado geral	Conservado	Dificuldade alimentar	Irritado / agitado	Letargia / coma
Cor da pele	Normal	Palidez	Cianose periférica	Cianose central ou generalizada
SpO₂	>95%	93-95%	<93%	Insuficiência respiratória

23. Necessidade de internamento

24. Padrão da radiografia do tórax, classificado sempre pelo mesmo observador, numa das seguintes alíneas, mutuamente exclusivas:

a) normal, b) hiperinsuflação, c) padrão intersticial, d) condensação / atelectasia

Variáveis laboratoriais

25. Resultado da pesquisa de vírus nas secreções nasais, através da utilização de um *kit* comercial de imunofluorescência (Viral Respiratory Kit® da Bartels Trinity Biotech Company). Este teste foi efectuado no laboratório do HSFX.

26. Resultado da determinação do número absoluto de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos no sangue periférico. Esta pesquisa foi efectuada, no laboratório do HSFX, apenas aos doentes internados.

27. Resultado do estudo da expressão de genes codificadores de citocinas na mucosa nasal, a partir de colheita efectuada no dia da observação inicial. Foi efectuada a determinação da expressão de duas citocinas com função Th2 (IL-4 e IL-13), e outras duas com função Th1 (IFN- γ e IL-12). A metodologia laboratorial usada, adaptada para esta investigação (RT-PCR) mediu, de forma semiquantitativa, a expressão relativa de cada citocina. A grandeza desta variável correspondeu ao ciclo de reacção de RT-PCR em que a citocina foi identificada na preparação analisada. Assim, quanto mais rápida essa reacção, menor o número de ciclos necessários para a evidenciar. O valor da variável corresponde aos ciclos de replicação necessários para evidenciar a molécula inicial, ou seja, quanto menor o valor numérico, maior a actividade inicial do gene de cada citocina.

Para cada citocina foi calculada a média da população. Com o objectivo de estudar os *odds ratio* de cada variável, o valor encontrado em cada doente foi reclassificado, conforme a sua relação com a média, de acordo com o quadro 7.

Quadro 7: Definição de predomínio Th1 ou TH2 de acordo com a posição relativa de cada amostra em relação à média.

Ciclo de amplificação por RT-PCR de cada citocina	Inferior à média	Superior à média
IL-4	Th2	Th1
IL-13	Th2	Th1
IL-12	Th1	Th2
IFN- γ	Th1	Th2

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

A cada criança incluída no estudo foram colhidas duas zaragatoas de secreções nasais. Após instilação de 1 ml de soro fisiológico estéril, foi introduzida, a 1 cm, no interior de cada narina, uma zaragatoa de madeira e algodão (Eurotubo® – Rubi, Espanha).

O produto de uma colheita foi enviado para o laboratório para pesquisa de vírus respiratórios. O produto da outra foi enviado para estudo da expressão dos genes das citocinas imunoreguladoras IL-4, IL-12, IL-13 e IFN- γ .

ESTUDO VIROLÓGICO

O estudo virológico foi efectuado através do teste comercial Viral Respiratory Kit® da Bartels Trinity Biotech Company, processado no laboratório de bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica do HSFx (Directora: Prof Doutora Julieta Esperança Pina). Este teste detecta, por imunofluorescência indirecta, Ag de superfície dos seguintes vírus: VSR, VPI, VI e adenovírus.

A amostra foi transportada de imediato para o laboratório, em tubo seco estéril, à temperatura de 2 a 8°C. Nos casos em que o processamento laboratorial não foi possível nas 72 horas subsequentes, as amostras foram conservadas em frigorífico de laboratório à temperatura de -70°C.

O procedimento laboratorial teve as seguintes fases:

- 1) Adição à amostra de anticorpos (Ac) monoclonais antivirais oriundos de rato (fornecidos pelo fabricante), com especificidade, respectivamente, para VSR, VPI, VI e adenovírus. Estes Ac fixaram-se aos Ag virais em questão, quando presentes.
- 2) Lavagem com solução tampão salina de fosfato (pH 7,0-7,6), para remoção de Ac livres.
- 3) Adição de imunoglobulina conjugada com isotiocianato de fluoresceína.
- 4) Lavagem para remoção de reagente não acoplado
- 5) Fixação e observação em microscópio de fluorescência com filtro e ampliação de 250-400x.
- 6) A reacção foi considerada positiva quando se observou fluorescência verde maçã, enquanto as amostras não infectadas surgiram sem fluorescência e com coloração rosada.

ESTUDO DAS CITOCINAS

Estas determinações foram efectuadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Sul (coordenador Dr Dário Ligeiro). A análise da expressão dos genes de IL-4, IL-12, IL-13 e IFN- γ , em células do exsudado nasal, foi efectuada por quantificação relativa dos ARNm de cada gene através do método normalmente abreviado como RT-PCR (*Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*).

O procedimento adaptado especificamente para este estudo, incluiu três fases:

- 1) Extracção do ARN total do crude celular retido na zaragatoa
- 2) Transcrição reversa do ARN em ADN complementar (ADNc)
- 3) Amplificação do ADNc específico com análise da cinética da reacção de RT-PCR, através da utilização de iniciadores e sondas fluorescentes para os genes em causa.

1) Extracção de ARN total

A zaragatoa colhida da mucosa nasal foi colocada numa solução estabilizadora do ARN (RNAlater® Ambion Inc) e conservada em frigorífico a -20°C, até ao transporte para o laboratório.

No laboratório, em ambiente estéril e dentro de uma câmara de fluxo laminar, cada amostra foi retirada da solução estabilizadora. A zaragatoa foi centrifugada a 14.000 xg (microcentrifuga Beckman®), a fim de retirar o excesso de RNAlater®.

De seguida procedeu-se à extracção de ARNm (*kit* Genelute Mammalian Total RNA kit® Sigma): num microtubo de 2ml contendo a zaragatoa, foram adicionados 250 µl de solução de lise, contendo 1 % v/v de 2-mercaptoetanol (agente redutor inactivador das RNases celulares).

O lisado resultante foi recolhido para coluna de filtração incluída no *kit*. Foi adicionado 1 volume de etanol a 70 % v/v, para maximizar a ligação dos ácidos nucleicos à membrana de uma coluna de afinidade incluída no *kit*. Esta foi, então, centrifugada a 10.000 xg e a solução colectada descartada.

Nesta fase, os ácidos nucleicos encontravam-se retidos na coluna de afinidade. Foram adicionados a esta coluna 500 µl de solução de lavagem 1 e feita centrifugação a 10.000 xg. À coluna seca adicionou-se 50 µl de solução de DNase I® (Qiagen), deixando a incubar, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Esta digestão com DNase I teve como objectivo degradar o ADN contaminante e obter uma solução extremamente pura de ARN total.

Após duas lavagens sucessivas com 500 µl de solução de lavagem 1 e 2 nas mesmas condições da primeira, o ARN foi eluído da membrana da coluna com 50 µl de água purificada, sem nucleases.

A concentração do ARN total de cada amostra foi quantificada por espectrofotometria na região ultravioleta a 260 nm (espectrofotómetro Beckman-Coulter DU530) e a pureza da solução avaliada pela razão de absorvâncias A_{260}/A_{280} .

O ARN extraído foi guardado a -80°C para posterior processamento.

2) Transcrição reversa

A reacção RT-PCR foi realizada por uma polimerase de ADN que reconhece, como modelo a copiar, as moléculas de ADN. Assim, tornou-se necessário, antes de prosseguir, transcrever o ARN existente na solução para ADNc.

Este procedimento, designado por transcrição reversa, consistiu numa reacção *in vitro* que submeteu o ARN à actividade de uma enzima (transcriptase reversa) na presença dos quatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) e iniciadores hexanucleótidos com sequência aleatória.

Utilizaram-se reagentes do sistema comercial “High Capacity cDNA Archive Kit®” (Applied Biosystems), de acordo com as indicações propostas pelo fabricante.

Foi preparada uma mistura mãe (Tampão RT – 5 µl; Iniciadores – 5 µl; dNTPs – 2,5 µl; Transcriptase reversa Multiscribe – 2,5 µl e água purificada Sigma – 15,5 µl). A esta mistura foi adicionado 50 µl da solução obtida na fase anterior, contendo 1 µg de ARN total purificado.

Submeteu-se a mistura resultante ao seguinte perfil térmico num termociclador ABI 9700 (Applied Biosystems): 25°C durante 10 minutos; 37°C durante 120 minutos; 4°C ∞.

A solução de ADNc resultante foi conservada para posterior processamento.

3) RT-PCR

RT-PCR é uma técnica em que, para além da reacção de PCR, é possível monitorizar, em tempo real, a formação do produto amplificado. Esta monitorização faz-se pela introdução de uma fonte de fluorescência.

Neste caso, recorreu-se à metodologia das sondas TaqMan® (oligonucleotídeos complementares a uma região pré-estabelecida do produto de PCR), que possuem, numa das extremidades, uma fluorescência e na outra um composto absorvente de fluorescência. A sonda Taqman, enquanto intacta, não emite fluorescência. Ao ser degradada pela polimerase de ADN, durante a RT-PCR, torna-se fluorescente.

Desta forma, é possível seguir a acumulação dos produtos da reacção e analisar a sua cinética, como um gráfico do sinal de fluorescência (R_n) vs número de ciclos.

Na figura 14 mostramos um exemplo de curva de amplificação. Nos ciclos iniciais a variação da fluorescência (ΔR_n) é mínima e define a linha base, onde a acumulação de produto amplificado está abaixo do limite de detecção do aparelho. Quando o ΔR_n ultrapassa esta linha, o produto amplificado passa a ser detectado. É necessário definir ciclo limiar (C_i) que corresponde ao número de ciclos em que a fluorescência ultrapassa o limiar de detecção. Uma amostra que contenha um maior número de ADNc para o gene em estudo, amplifica primeiro e, portanto, o sinal de fluorescência cruza mais cedo a linha de limiar, ou seja tem um C_i mais baixo que uma amostra com uma concentração inferior de ADN.

O número do ciclo onde a curva de amplificação cruza a linha de limiar (C_i) é usado para os cálculos de quantificação da amostra.

Os estudos efectuados por RT-PCR podem ser desenhados para utilizar a quantificação relativa ou a quantificação absoluta. A quantificação relativa, utilizada neste estudo, é baseada na comparação com um transcrito referência, uma vez que descreve a variação na expressão do gene alvo relativamente a essa referência (controlo).

É usado um gene referência, que se sabe ter expressão constante em todos os tipos celulares. Neste estudo usou-se, para esse efeito, o ARN ribossómico 18S (RNA18S), que foi submetido às mesmas condições que os genes estudados.

Assim, o C_t do gene referência foi subtraído do C_t do gene alvo e a diferença resultante (ΔC_t) corresponde à quantificação da expressão do gene que pretendemos estudar. ($\Delta C_t = C_{ta} - C_{thk}$, em que C_{ta} = Ciclo limiar do gene alvo e C_{thk} = Ciclo limiar do gene referência).

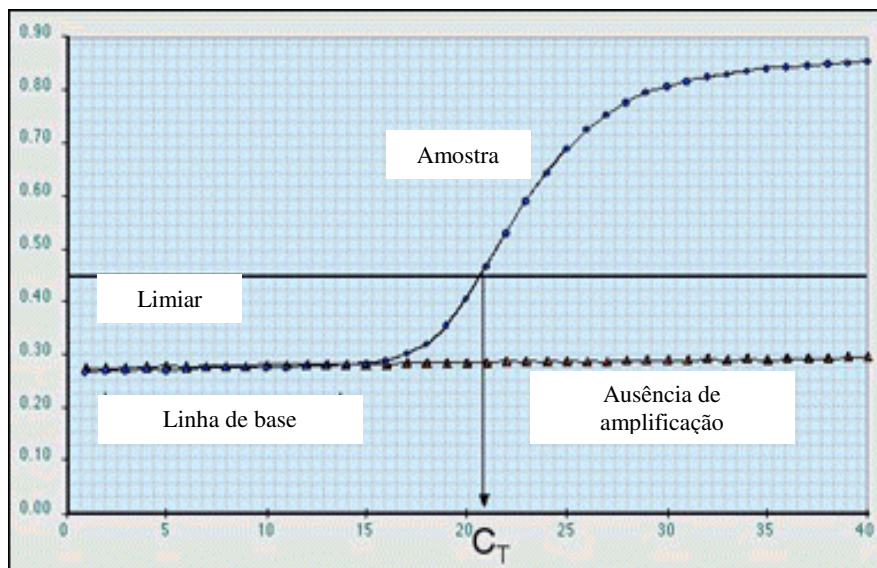


Figura 14: Curva de amplificação, que mostra a linha de base onde a fluorescência ainda é muito fraca; o limiar; e o ciclo limiar (C_t) onde a curva de amplificação cruza o limiar. Quando a amplificação não ocorre a curva correspondente à amostra fica sempre abaixo da linha de limiar (adaptado de PE Biosystems Bulletin 'DNA/RNA Real-time Quantitative PCR', pp 1-8).

A actividade de cada uma das citocinas seleccionadas (IL-4, IL-13, IFN- γ , IL-12), foi avaliada, de forma semiquantitativa, através de comparação das suas expressões com a expressão do gene ARN-18S.

Para estas determinações foram usados pares de iniciadores e sondas Taqman® fornecidos pela Applied Biosystems, com concentrações e eficiência pré-otimizadas pelo fornecedor.

Os ensaios de RT-PCR foram realizados num sistema Applied Biosystems 7900HT Fast RT-PCR, em duplicado para cada gene alvo e *gene referência*, usando-se o C_t médio no cálculo das expressões relativas.

As reacções foram preparadas de acordo com a seguinte estequiometria por reacção num volume total de 25 μ l: Taqman PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems) - 12,5 μ l; Água MilliQ - 9 μ l; Iniciadores + Sonda Taqman Applied Biosystems - 2,5 μ l. A esta solução foi adicionado 1 μ l de ADNc de cada amostra. Foi preparada igualmente uma reacção controlo negativo com cada um dos iniciadores e sondas específicos a que não foi adicionado o ADNc de forma a verificar possíveis contaminações de reagentes. As reacções foram aplicadas numa placa de PCR compatível com o equipamento e submetidas a 40 ciclos de PCR.

A detecção da fluorescência durante a reacção de PCR foi feita pelo sistema ABI de detecção sob controlo do *software* SDS v 2.3 também utilizado no tratamento / normalização dos dados obtidos para cada reacção.

Na figura 15 encontra-se um exemplo de 10 reacções efectuadas neste estudo. Detectou-se fluorescência para os genes alvos entre o 20º e o 35º ciclo de amplificação da reacção, enquanto, para o ARN 18 S (*gene referência*), a fluorescência surgiu logo ao 5º ciclo. Nas amostras designadas como NTC, não chegou a ser detectada fluorescência até ao final da reacção (45 ciclos), pelo que foram consideradas não detectáveis. Valores inferiores corresponderam a menor necessidade de amplificação e, portanto, a maior expressão dos genes na amostra.

Para cada amostra, os C_t obtidos foram então exportados para uma folha de calculo MS Excel para obtenção das médias de cada replicado e cálculo da expressão relativa normalizada.

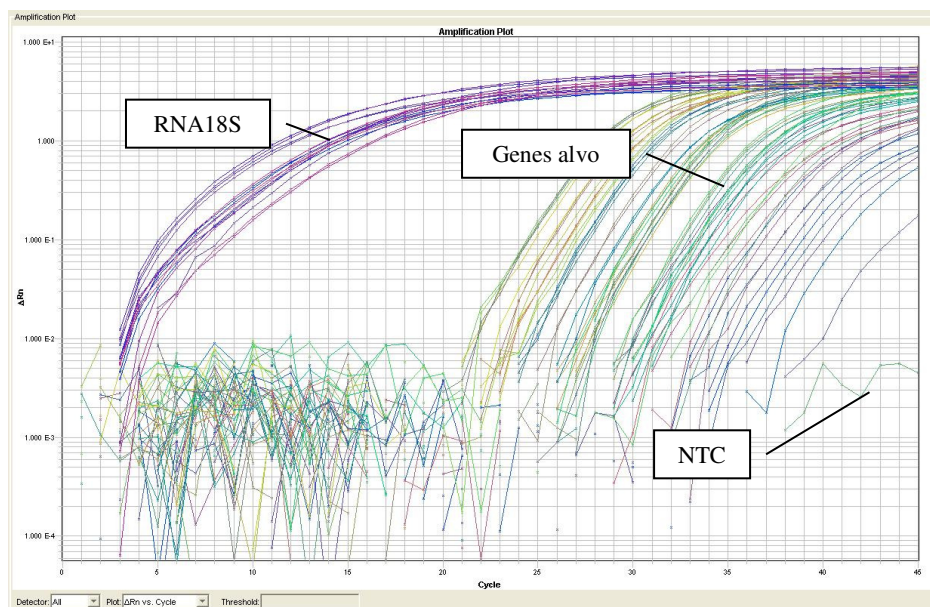


Figura 15: Histograma ΔRn vs ciclo de PCR representativo da análise da cinética da amplificação de 10 amostras.

SEGUIMENTO DOS DOENTES

Todas as crianças foram reavaliadas, pelo investigador principal, em consulta de pneumologia infantil. A primeira consulta foi agendada para as quatro semanas subsequentes ao episódio inicial ou após a alta hospitalar.

A todas as crianças que compareceram à consulta no HSFx foi efectuado um exame clínico e os seguintes exames laboratoriais: hemograma, doseamento de IgE total, pesquisa sérica de multialergénios (Phadiatop®) inalatórios e alimentares, doseamentos séricos de IgG, IgM e IgA e radiografia do tórax.

Nesta fase foram excluídas do estudo as crianças que apresentassem valores de IgE total superiores a três desvios padrão acima da média para a idade, Phadiatop® alimentar ou inalatório positivo ou que apresentassem valores de IgG, IgA ou IgM três desvios padrão inferiores à média para a idade (Long 2002).

Sempre que a situação clínica o justificava, os doentes foram avaliados para ulterior esclarecimento etiológico da sibilância recorrente. Foram efectuados, nesses casos, de forma adequada a cada doente, os seguintes exames complementares de diagnóstico: prova tuberculínica, doseamento de cloretos no suor, broncofibroscopia, pHmetria,

estudos das populações linfocitárias, tomografia computadorizada do tórax, angiorressonância do mediastino ou cintigrafia pulmonar de perfusão.

Sempre que foi detectada alguma explicação diagnóstica anatómica ou funcional (imunodeficiência, anomalia congénita da árvore brônquica, fístula traqueoesofágica, refluxo gastroesofágico, tuberculose, ou outras), as crianças foram excluídas do estudo embora, caso fosse desejado pela família, continuassem a ser seguidas na mesma consulta hospitalar.

As crianças que não compareceram à consulta foram contactadas por via telefónica, com periodicidade trimestral, tendo sido efectuado uma anamnese sumária semelhante à efectuada presencialmente. (anexo 3).

O acompanhamento e a terapêutica foram realizados de acordo com os protocolos em vigor no Serviço de Pediatria do HSFx e as boas práticas médicas.

Aos três anos de idade, procedeu-se a nova anamnese incidindo electivamente sobre sintomas de rinite alérgica (crises esternutatórias, prurido nasal, rinorreia seromucosa, obstrução nasal e congestão ocular).

No final do período de seguimento, as crianças foram enquadradas nas categorias “sibilante” (se tivessem tido um total de três ou mais episódios de sibilância diagnosticada por médico) ou “não sibilantes” (todos os restantes).

Foi aplicado a cada criança sibilante o Índice Preditivo de Asma (IPA), de acordo com Castro-Rodriguez e colaboradores (quadro 8). A presença de pelo menos um critério *major* associado a, pelo menos, dois critérios *minor* correspondeu a um IPA positivo. Caso contrário considerou-se negativo:

Quadro 8: Critérios para o cálculo do IPA em crianças com 3 anos de idade e sibilância recorrente (Castro-Rodríguez 2006).

Critérios major	Critérios minor
Asma num dos pais Eczema atópico	Rinite alérgica Sibilância sem rinofaringite Eosinofilia

Foram, desta forma, consideradas duas novas variáveis para o estudo:

Variáveis provenientes do seguimento dos doentes

- 28) Classificação dos doentes no final do estudo em sibilantes ou não sibilantes
- 29) Índice preditivo de asma (positivo ou negativo)

ASPECTOS ÉTICOS

A inclusão das crianças no estudo foi precedida por consentimento informado e esclarecido do tutor legal. Após explicação verbal do estudo em curso por parte do médico, foi entregue a cada família um folheto explicativo, que incluía o contacto do investigador principal (anexo 4).

A Comissão de Ética do HSFX aprovou a realização deste estudo (anexo 5).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda a informação foi registada de forma précodificada numa folha de cálculo do programa SPSS 9.0 para Windows.

Foi feita a estatística descritiva de todos os dados recolhidos.

As variáveis qualitativas foram comparadas pelo teste do Qui quadrado e, quando indicado, pelo teste exacto de Fisher. As variáveis quantitativas foram estudadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ou, se tivessem distribuição normal, pelo teste t de Student.

Para detecção de relação entre variáveis contínuas foi aplicado o teste de correlação de Pearson. Os *odds ratio* da análise univariada foram detectados por regressão logística linear. Nos casos em que se relacionavam variáveis contínuas entre si, foi calculado o coeficiente de correlação ou de regressão, em lugar de *odds ratio*.

Para as análises multivariadas, foram construídos modelos de regressão logística multinomial, tendo sido utilizado o método *forward stepwise* para seleccionar as variáveis significativas. Para ajustamento final do modelo obtido, foi usado o teste de Hosmer e Lemeshow.

Foi considerado com significado estatístico, em todas as análises, o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados foram sistematizados do seguinte modo:

1. Estatística descritiva, para melhor compreensão das características da amostra
2. Estudo univariado da relação entre os diversos parâmetros e a ocorrência de sibilância recorrente
3. Estudo univariado da relação entre os diversos parâmetros e o comportamento das citocinas da mucosa nasal
4. Modelo multivariado com identificação final das variáveis independentes com relação com a evolução para sibilância recorrente
5. Modelo multivariado com reconhecimento definitivo das variáveis independentes com relação estatisticamente significativa com a expressão das citocinas da mucosa nasal.

AMOSTRA ESTUDADA

O estudo incidiu inicialmente sobre 188 crianças.

No decorrer do seguimento, foram excluídos 36 doentes, pelos seguintes motivos:

Identificação de outra causa de sibilância recorrente (n=25), a saber:

Défice de IgA e/ou IgG:	8
IgE elevada ou Phadiatop® positivo:	7
Refluxo gastroesofágico:	6
Bronquiolite obliterante:	1
Anel vascular:	1
Estenose brônquica congénita:	1
Suspeita de fibrose quística:	1

Recusa dos pais ou impossibilidade de contacto (n=11)

Por conseguinte, a amostra que fez parte do estudo corresponde a 152 crianças. Para melhor compreensão das características da amostra populacional estudada, são representadas esquematicamente, na figura 16, as diferentes fases do estudo.

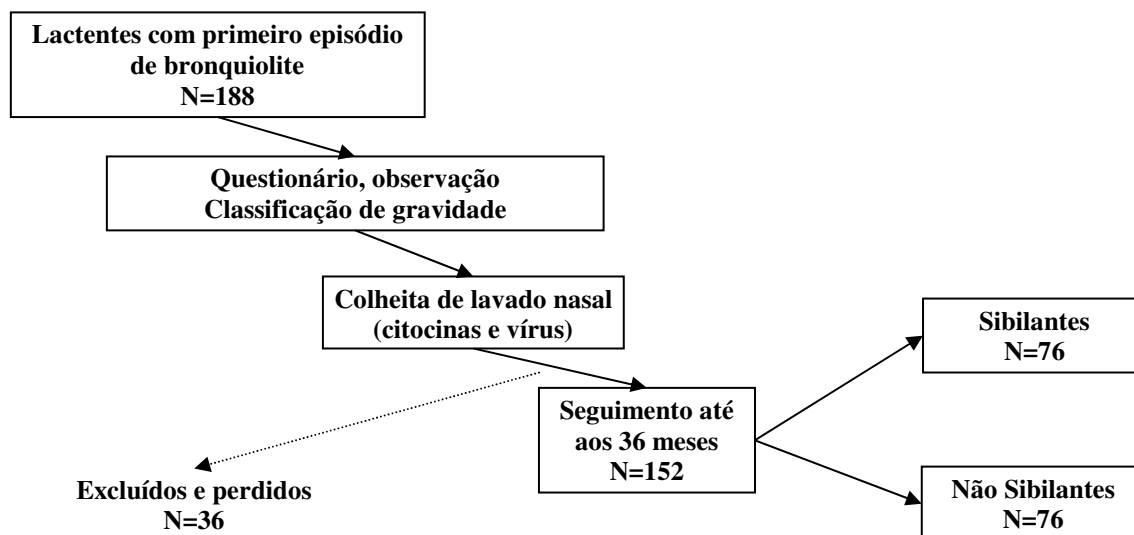


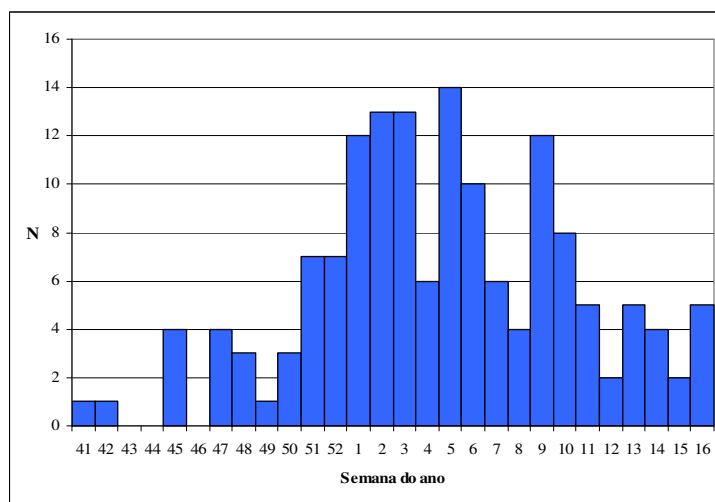
Figura 16: Fluxograma referente à exclusão dos doentes no decorrer do estudo.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Variáveis clínicas

1) **Data do primeiro episódio de bronquiolite:** Cento e vinte e três casos (80,9%) foram incluídos no estudo entre 11 de Outubro de 2004 e 24 de Abril de 2005, isto é, entre as semanas epidémicas 41 e 16 desses anos.

Semana do ano	N	%
41-42	2	1,3
43-44	0	0
45-46	4	2,6
47-48	7	4,6
49-50	4	2,6
51-52	14	9,2
1-2	25	16,4
3-4	19	12,5
5-6	24	15,8
7-8	10	6,6
9-10	20	13,2
11-12	7	4,6
13-14	9	5,9
15-16	7	4,6



Quadro 9 e Figura 17: Distribuição em quadro e histograma dos doentes conforme as semanas do estudo.

2) Idade

No momento de inclusão na investigação, os doentes tinham uma média de idades de 200,6 dias (6 meses e 20 dias), com um desvio-padrão de 147,3 dias.

O quadro 10 mostra a distribuição das idades das crianças por trimestre. Na figura 18 apresenta-se o histograma de frequências desta variável:

Quadro 10: Distribuição dos doentes por idade.

Idade (meses)	N	%
Menos de 3	43	28,3
De 3 a 6	38	25,0
De 6 a 9	32	21,1
De 9 a 1	18	11,8
De 12 a 15	9	5,9
De 15 a 18	6	3,9
De 18 a 21	3	2,0
De 21 a 24	2	1,3

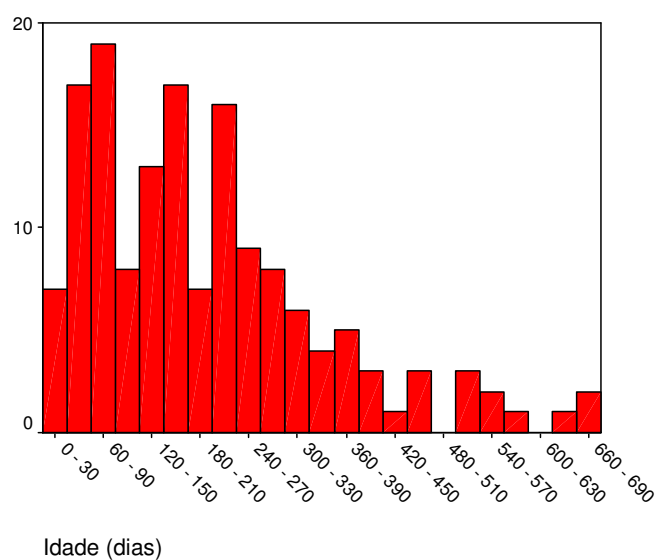


Figura 18: Distribuição em histograma dos doentes por idade.

3) Sexo

Predominaram as crianças do sexo masculino (91 ou 59,9%).

4) Raça

Cento e trinta (85,5%) crianças eram de raça branca, incluindo cinco de etnia cigana. Vinte doentes eram de raça negra e dois de raça amarela.

5) Escolaridade dos pais

Esta variável teve a seguinte distribuição (quadro 11):

Quadro 11: Distribuição da amostra, de acordo com o grau de escolaridade (em anos) dos pais.

Escolaridade dos pais (anos)	Mãe		Pai	
	N	%	N	%
Menos de 5 anos	15	10,2	16	11,1
5 a 9 anos	45	30,6	52	36,1
10 a 12 anos	42	28,6	41	28,5
Mais de 12 anos	45	30,6	35	24,3

Não foi possível obter dados sobre a escolaridade dos progenitores em cinco casos (crianças que residiam desde o período neonatal em centro de acolhimento). A escolaridade do progenitor masculino era desconhecida em três outros casos.

6) Número de coabitantes

O número de coabitantes variou entre um e 25 (as cinco crianças que residiam em centros de acolhimento). A distribuição surge representada no quadro 12:

Quadro 12: Número de coabitantes de cada criança.

Nº de coabitantes	N	%
1	5	3,3
2	51	33,6
3	51	33,6
4	19	12,5
5	8	5,2
≥6	18	11,8

7) Idade da mãe

Doze (7,9%) mães tinham menos de 20 anos; 20 (13,2%) tinham idade entre os 20 e os 24 anos; 53 (34,9%) tinham entre 25 e 29 anos; 41 (26,9%) entre 30 e 34 anos e 26 (17,1%) tinham idade superior ou igual a 35 anos.

8) Irmãos

Sessenta e três (41,4%) crianças eram filhas únicas; 62 crianças (40,8%) tinham um irmão, 17 (11,2%) tinham dois e 10 (6,6%) mais do que dois irmãos.

9) Tabagismo passivo

Em 89 (58,6%) casos, foi referido consumo de tabaco entre os coabitantes.

10) Antecedentes familiares de atopia

Foi detectada atopia em 48 de 148 mães (32,4%) e em 37 de 146 pais (25,3%). Entre as 89 crianças com irmãos, encontrou-se atopia na fratria em 24 casos (27,0%). Nas restantes situações não foi possível recolher dados relativos a atopia familiar.

O conjunto destas três variáveis permitiu estabelecer que 81 das 152 crianças (53,3%) tinham familiares directos com atopia conhecida.

11) Idade gestacional

Cento e trinta crianças (85,5%) tinham nascido com idade gestacional entre 37 e 40 semanas e 22 (14,5%) com idade gestacional compreendida entre 32 e 37 semanas.

12) Peso de nascimento

O peso de nascimento das crianças estudadas situou-se entre 2500 e 4000 g em 128 (84,3%) casos, entre 1500 e 2499 g em 18 (11,8%) e acima dos 4000 g em seis (3,9%).

13) Exposição pré-natal a tabaco

Foi possível recolher informação relativamente a esta alínea em 148 casos; 41 das respectivas mães (27,7%) tinham fumado durante a gravidez.

14) Aleitamento materno

Noventa e cinco crianças (62,5%) eram ou tinham sido amamentadas, em exclusivo, até aos três meses de idade.

15) Frequência diurna de espaços comuns

Verificámos que 54 das 101 crianças com idade superior a 120 dias (53,5%) frequentavam infantário, creche ou ama com mais de seis crianças.

16) Convívio diário com outras crianças

Setenta e quatro crianças (48,7%) conviviam diariamente com outras crianças (irmãos ou outras crianças que frequentassem os mesmos espaços comuns).

17) Contacto diário com animais domésticos

Em 39 casos (25,7%) verificou-se contacto diário com animais domésticos (23 cães, 12 gatos e 4 aves).

18) Tipo de aquecimento doméstico

Trinta e quatro crianças (22,4%) residiam em habitação com aquecimento doméstico (14 lareiras e 20 aquecedores a óleo).

19) Antecedentes pessoais de atopia

Em 24 casos (15,8%) havia antecedentes pessoais de eczema atópico. Não foi mencionado nenhum caso de alergia alimentar.

20) Peso actual

Na data da primeira bronquiolite, a média do peso das crianças era 7218 g e o desvio-padrão de 2431 g. A representação gráfica desta variável consta da figura 19:

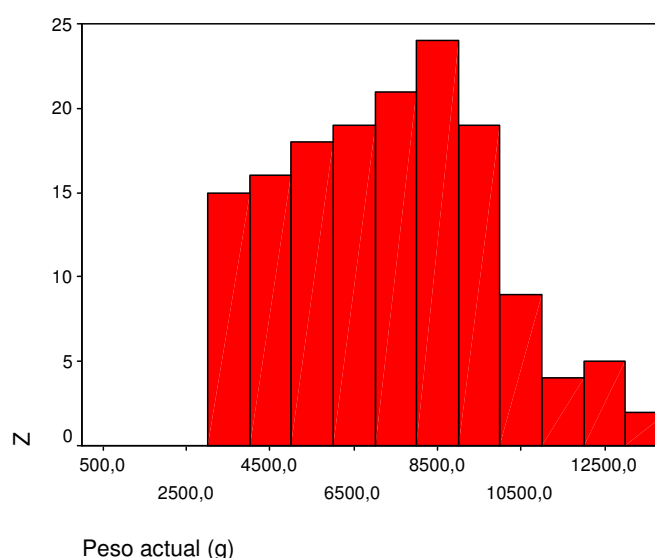


Figura 19: Histograma de distribuição do peso dos doentes, na data do primeiro episódio de bronquiolite.

21) Febre

O episódio inicial de sibilância foi acompanhado de febre em 58 casos (38,2%), cursando com apirexia nos restantes.

22) Índice de gravidade

Esta variável teve a distribuição de frequências representada no quadro 13 e figura 20.

Quadro 13: Índice de gravidade.

Índice	N	%
0	0	0
1	4	2,6
2	5	3,3
3	10	6,6
4	15	9,9
5	18	11,8
6	17	11,2
7	16	10,5
8	10	6,6
9	9	5,9
10	8	5,3
11	9	5,9
12	10	6,6
13	7	4,6
14	4	2,6
15	5	3,3
16	4	2,6
17	1	0,7
18	0	0

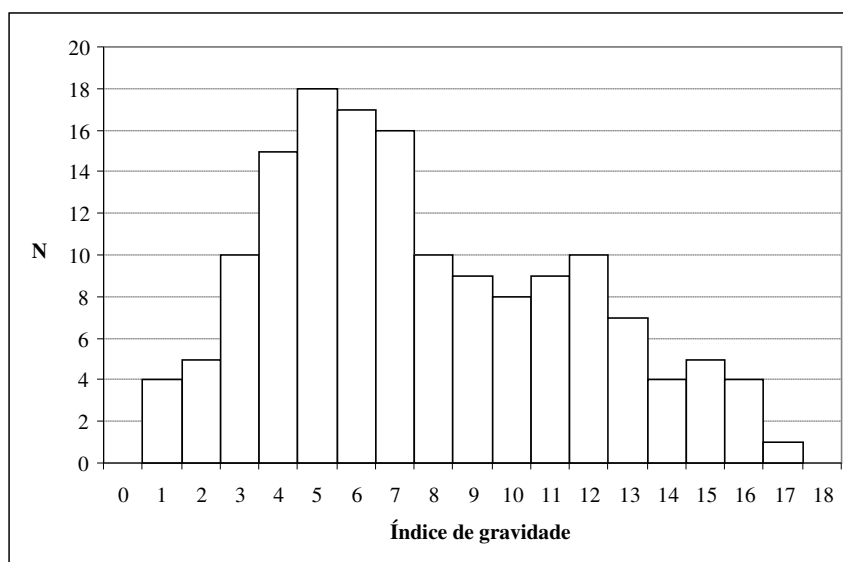


Figura 20: Histograma do índice de gravidade da bronquiolite inicial.

23) Necessidade de internamento

Foram internados 62 doentes (40,8%). Os restantes 90 (59,2%) foram tratados em ambulatório.

24) Radiografia do tórax

Nos 133 doentes em que foi efectuada radiografia do tórax no dia da inclusão no estudo, foram encontrados os seguintes padrões:

Hiperinsuflação: 53 (39,8%)

Padrão intersticial: 60 (45,2%)

Condensação / Atelectasia: 20 (15,0%).

Variáveis laboratoriais

25) Pesquisa de Ag víricos

Foi possível obter resultados de pesquisa de Ag víricos nas secreções nasais em 143 crianças. Os resultados foram os seguintes:

Negativa: 52 (36,4%)

VSR: 74 (51,7%)

Outros: 17 (11,9%)

Nestes, referem-se nove identificações de VPI, seis de VI e dois de Adenovírus. Não foi detectado nenhum caso de identificação simultânea de mais de um agente.

26) Número absoluto de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos

Esta variável foi considerada apenas nos doentes internados (n=62), com a seguinte distribuição (média $\pm$ desvio-padrão):

Leucócitos: 13978 ± 6050 / μ l

Neutrófilos: 6882 ± 4299 / μ l

Linfócitos: 5766 ± 3879 / μ l

Eosinófilos: 177 ± 227 / μ l

As figuras 21 a 24 integram os respectivos gráficos de distribuição.

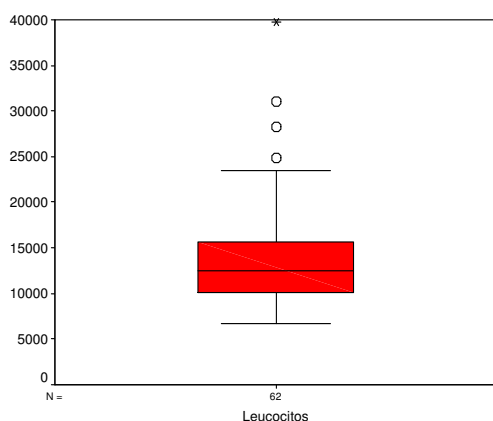


Figura 21:

Distribuição do número de leucócitos (cels/ μ l) efectuada nos doentes internados.

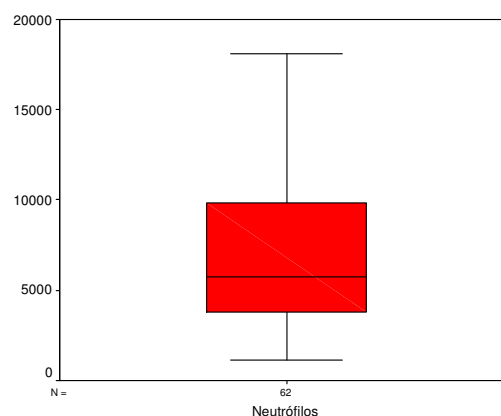


Figura 22:

Distribuição do número de neutrófilos (cels/ μ l) efectuada nos doentes internados.

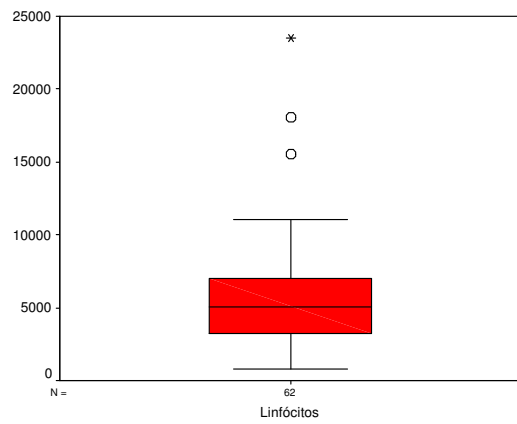


Figura 23:
Distribuição do número de linfócitos (cels/μl)
efectuada nos doentes internados.

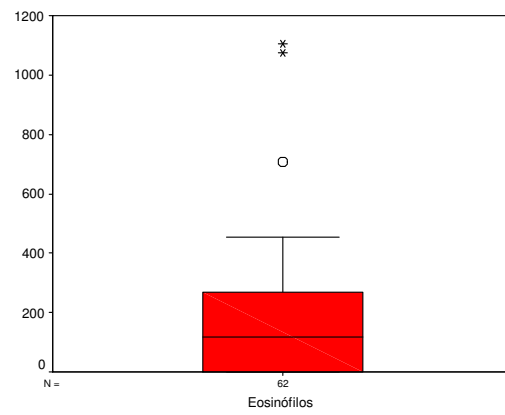


Figura 24:
Distribuição do número de eosinófilos (cels/μl)
efectuada nos doentes internados.

27) Estudos das diferentes citocinas da mucosa nasal

A expressão dos genes das quatro citocinas estudadas foi a seguinte (Quadro 14):

Quadro 14: Distribuição dos valores de expressão genética dos genes das citocinas estudadas

Via	Citocina	N (%)	Média±desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Th2	IL-4	82 (53,9%)	26,768 ± 4,360	12,710	31,876
	IL-13	104 (68,5%)	23,535 ± 3,490	12,390	29,899
Th1	IL-12	120 (78,9%)	19,806 ± 3,710	9,971	27,213
	IFN-γ	119 (78,3%)	20,664 ± 4,161	9,428	29,880

Estas variáveis tiveram distribuição gaussiana (figura 25).

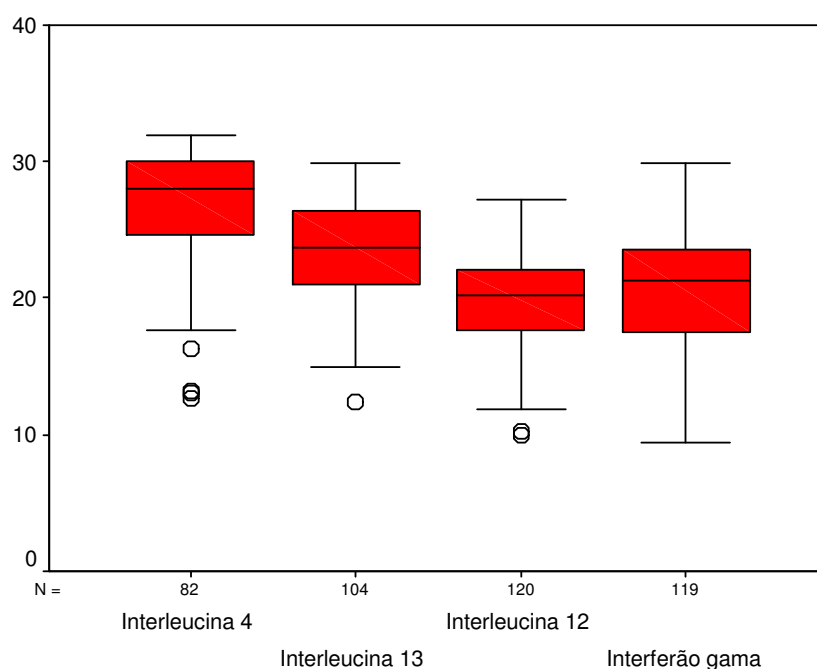


Figura 25: Distribuição gráfica da expressão dos genes das quatro citocinas estudadas à superfície da mucosa nasal.

Variáveis provenientes do seguimento dos doentes

Das 152 crianças consideradas no final do seguimento, 99 (65,1%) frequentaram a consulta de forma regular. Às restantes 53, foi efectuado inquérito telefónico. No fluxograma seguinte (figura 26) encontra-se representada a forma de reavaliação e o tipo de evolução clínica, o que permitiu estabelecer a classificação final de cada caso.

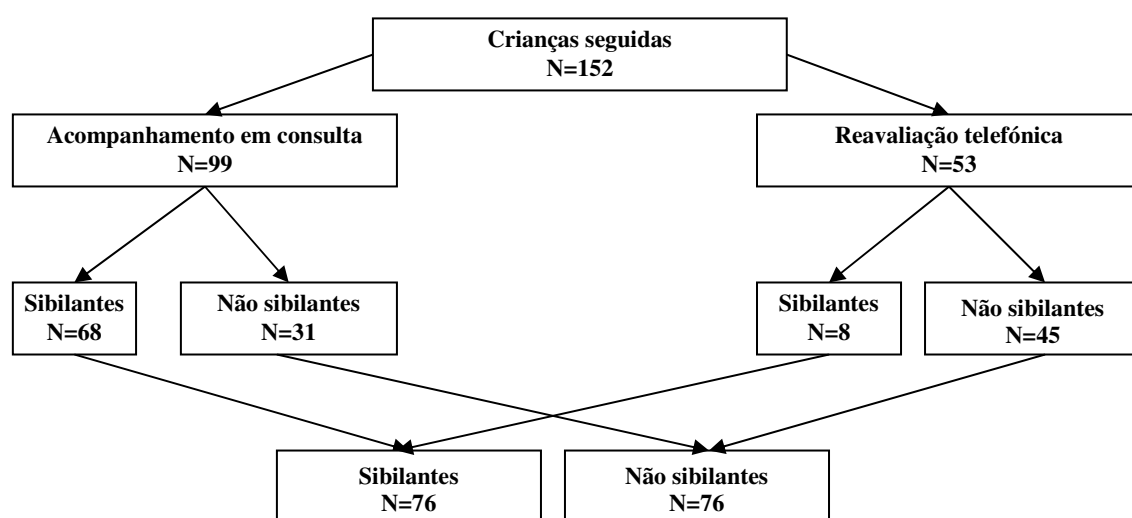


Figura 26: Representação, em fluxograma, do tipo de seguimento e classificação final dos doentes.

28) Classificação final dos doentes

Dos 152 doentes, 76 (50,0%) foram classificados como sibilantes, e outros 76 (50,0%) não sibilantes.

29) Índice preditivo de asma

O índice preditivo de asma, atribuído a cada uma das 76 crianças sibilantes no final do período de seguimento, foi positivo em 37 (48,7%) e negativo em 39 (51,3%) crianças.

ANÁLISE UNIVARIADA DOS PARÂMETROS ESTUDADOS

A análise univariada dos diversos parâmetros permitiu identificar as variáveis com significado estatístico ($p < 0,05$), em relação aos objectivos do estudo.

A apresentação destes resultados é feita do seguinte modo:

1. Identificação de parâmetros associados à ocorrência de sibilância recorrente após uma primeira bronquiolite
2. Identificação dos parâmetros associados ao padrão de resposta imune (de tipo Th1 ou Th2) num primeiro episódio de bronquiolite.

No Anexo 6 são apresentados, em pormenor, os resultados oriundos da análise univariada de todos os parâmetros avaliados em função da evolução para sibilância recorrente.

Parâmetros associados à ocorrência de sibilância recorrente

Os parâmetros associados à ocorrência de sibilância recorrente, que com significado estatístico, são discriminados a seguir, no quadro 15 e nas figuras 27 a 37.

Quadro 15: Análise univariada dos parâmetros associados a sibilância recorrente ($p < 0,05$).

(IC: intervalo de confiança)

PARÂMETROS COM SIGNIFICADO ESTATÍSTICO	SIBILANTE	NÃO SIBILANTE	ODDS RATIO	IC95%	p
Idade (dias) Média $\pm$ desvio-padrão	151 $\pm$ 105	250 $\pm$ 166	0,9954	0,9918-0,9978	<0,001
Tabagismo passivo % Sim	67,1	50,0	2,0401	1,0582-3,9343	0,032
Atopia na mãe % Sim	40,5	24,3	2,1214	1,0475-4,2936	0,035
Exposição ante-natal a tabaco % Sim	36,5	18,9	2,4617	1,1628-5,2109	0,017
Peso na 1ª bronquiolite (g) Média $\pm$ desvio-padrão	6579 $\pm$ 2328	7837 $\pm$ 2402	0,9998	0,9996-0,9999	0,001
Febre % Sim	25,0	51,3	0,3160	0,1591-0,6292	0,001
Índice de gravidade (Média $\pm$ desvio-padrão)	8,7 $\pm$ 4,0	6,7 $\pm$ 3,5	1,1570	1,0579-1,2653	0,001
Internamento % Sim	48,7	32,9	1,9353	1,0044-3,7325	0,048
Vírus respiratórios % positivos	78,3	51,4	3,4116	1,6407-7,0878	0,001
VSR % positivos	69,6	35,1	4,220	2,0939-8,5020	<0,001
IL-4 (acima dos 6 meses) Média $\pm$ desvio-padrão	26,557 $\pm$ 5,077	28,893 $\pm$ 2,517	0,7560	0,5930-0,9570	0,044

Cada um destes parâmetros é descrito em pormenor nos gráficos seguintes:

Idade

Nas crianças em que o primeiro episódio de bronquiolite ocorreu em idade mais precoce, observou-se que a evolução para sibilância recorrente foi mais frequente.

($p < 0,001$)

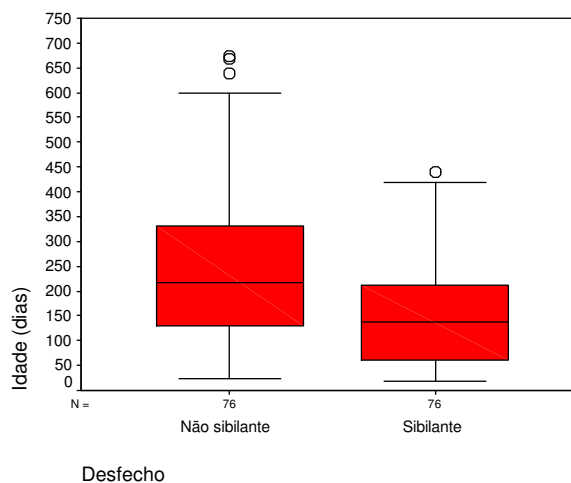


Figura 27: Idade da primeira bronquiolite e sibilância recorrente.

Tabagismo passivo pós-natal:

A sibilância recorrente associou-se, de forma directa, ao contacto com fumo de tabaco no domicílio.

($p = 0,032$)

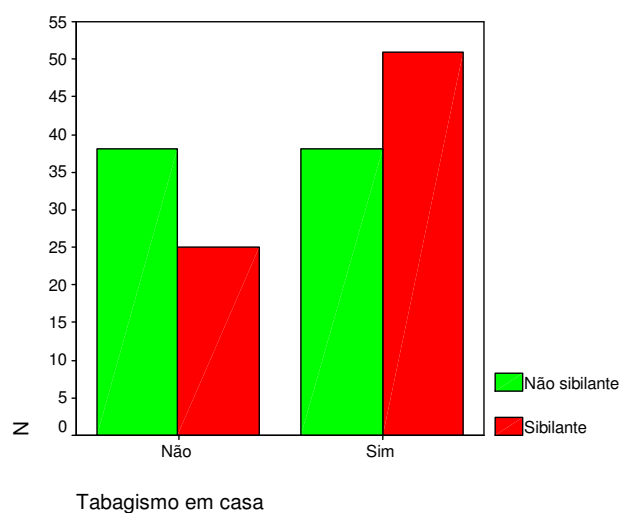


Figura 28: Tabaco no domicílio e sibilância recorrente

Atopia na mãe:

Uma história familiar de doença alérgica na mãe associou-se a evolução para sibilância recorrente. ($p=0,035$).

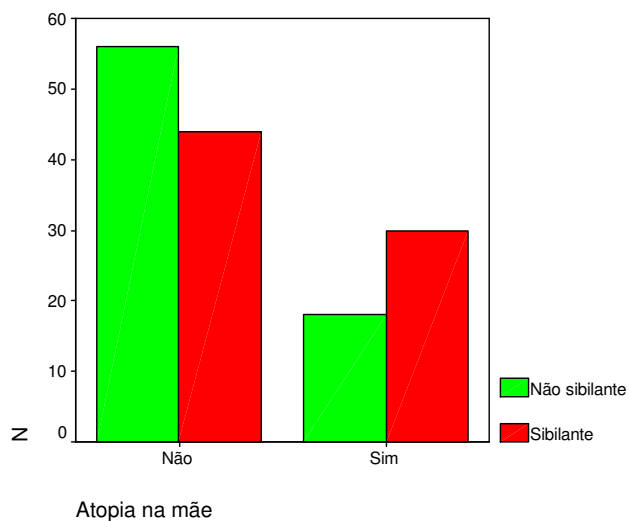


Figura 29: História materna de atopia e sibilância recorrente

Exposição ante-natal ao tabaco:

A exposição ante-natal ao fumo de tabaco associou-se a sibilância recorrente. ($p=0,017$).

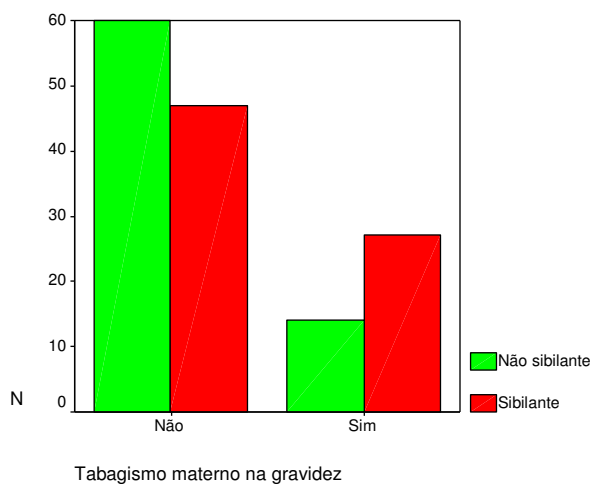


Figura 30: Exposição antenatal a tabaco e sibilância recorrente

Peso actual:

As crianças com peso inferior, na altura do primeiro episódio de bronquiolite, evoluíram mais frequentemente para sibilância recorrente.

($p=0,001$)

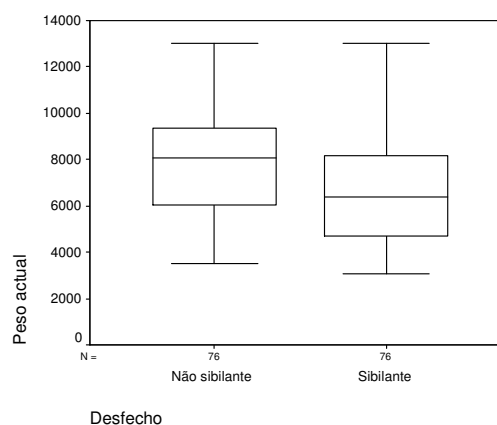


Figura 31: Peso inicial e sibilância recorrente.

Febre:

A ocorrência de febre, no primeiro episódio de bronquiolite, esteve inversamente relacionada com a evolução para sibilância recorrente.

($p=0,001$).

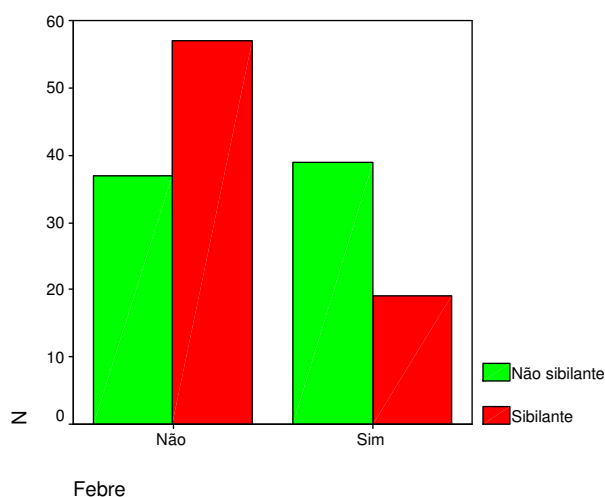


Figura 32: Presença de febre no episódio inicial e sibilância recorrente

Índice de gravidade:

As crianças com um índice de gravidade mais elevado na primeira bronquiolite evoluíram mais frequentemente para sibilância recorrente.

($p=0,001$).

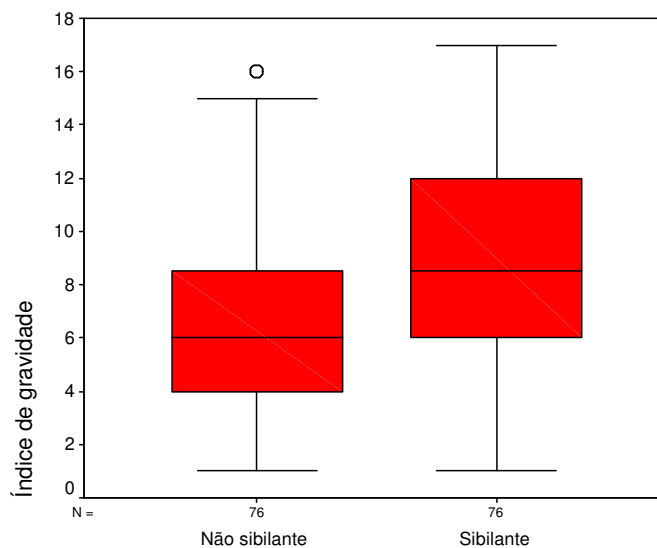


Figura 33: Gravidade da primeira bronquiolite e sibilância recorrente

Internamento:

Da mesma forma, o internamento hospitalar no episódio inicial associou-se a maior incidência de sibilância recorrente.

($p=0,048$).

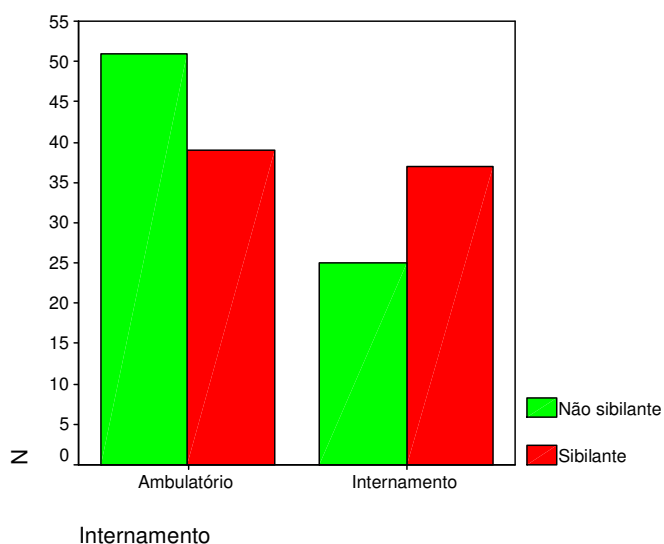


Figura 34: Necessidade de internamento no episódio inicial e sibilância recorrente

Vírus respiratórios: A identificação de vírus respiratórios, principalmente VSR, no primeiro episódio de bronquiolite, foi mais frequente nas crianças que evoluíram para sibilância recorrente ($p=0,001$)

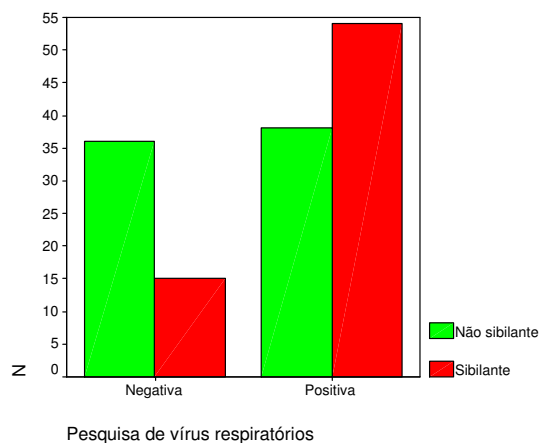


Figura 35: Pesquisa de vírus nas secreções nasais na primeira bronquiolite e sibilância recorrente.

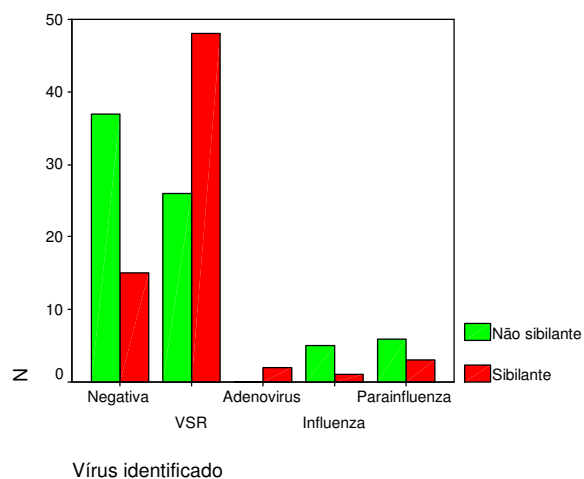


Figura 36: Estirpes virais identificadas na primeira bronquiolite e sibilância recorrente.

Citocinas da mucosa nasal:

No que diz respeito à evolução para sibilância recorrente, não encontramos, na amostra considerada globalmente, qualquer diferença em relação à expressão génica de citocinas representativas da via Th1 ou Th2.

No entanto, estudando a amostra por subgrupos etários, as diferenças tiveram significado estatístico. Nas crianças em que o primeiro episódio de bronquiolite ocorreu após os seis meses de idade, a expressão de IL-4 foi superior entre as que evoluíram para sibilância recorrente ($p=0,044$). Esta diferença traduz predomínio Th2 neste subgrupo de doentes (figura 37).

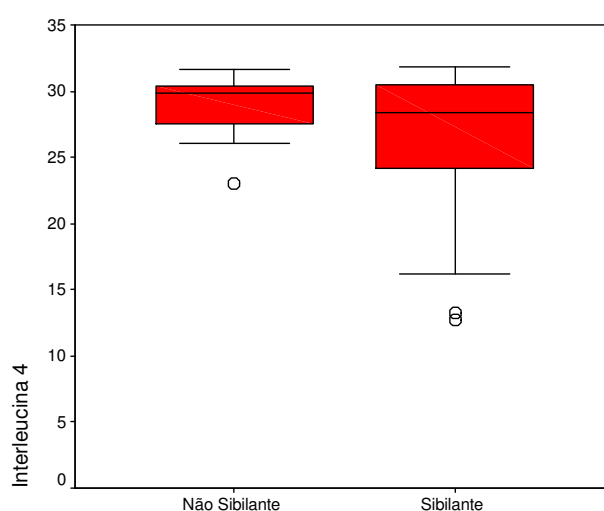


Figura 37: Distribuição gráfica das diferentes expressões de IL-4 nas crianças com mais de seis meses de idade, e sua relação com a subsequente evolução para sibilância recorrente ($p=0,044$).

Comportamento das diversas citocinas associadas à via Th1 ou Th2

Estudámos o comportamento de quatro citocinas detectadas na mucosa nasal e a forma como variaram com os diversos parâmetros avaliados, no decorrer do primeiro episódio de bronquiolite aguda.

Duas citocinas estudadas são representativas de predomínio Th2 (IL-4 e IL-13); as outras duas traduzem predomínio Th1 (IFN- γ e IL-12).

Nos casos em que encontrámos significado estatístico ($p < 0,05$), a expressão de cada citocina em relação aos parâmetros estudados é apresentada de seguida.

A análise estatística do comportamento das quatro citocinas em relação com todos os parâmetros estudados encontra-se discriminada nos anexos 7 a 10.

Interleucina 4 (Th2)

A expressão de IL-4 no decorrer de uma bronquiolite aguda foi mais baixa nos casos em que foram isolados vírus respiratórios, principalmente VSR (**predomínio Th1**).

Quadro 16: Análise univariada dos parâmetros com influência sobre a variação de IL-4 ($p < 0,05$).

PARÂMETROS ESTUDADOS	SIM	NÃO	ODDS RATIO	IC95%	p
Vírus respiratórios	27,695 $\pm$ 3,476	24,238 $\pm$ 5,496	1,1962	1,0582-1,3532	0,013
VSR	27,638 $\pm$ 3,605	25,088 $\pm$ 5,203	1,1468	1,0235-1,2837	0,011

Nas figuras 38 e 39 representam-se estas variáveis:

Vírus respiratórios: A identificação de vírus respiratórios na primeira bronquiolite associou-se a aumento da necessidade de amplificação de IL-4 por RT-PCR, o que corresponde a **predomínio Th1**.

($p=0,013$)

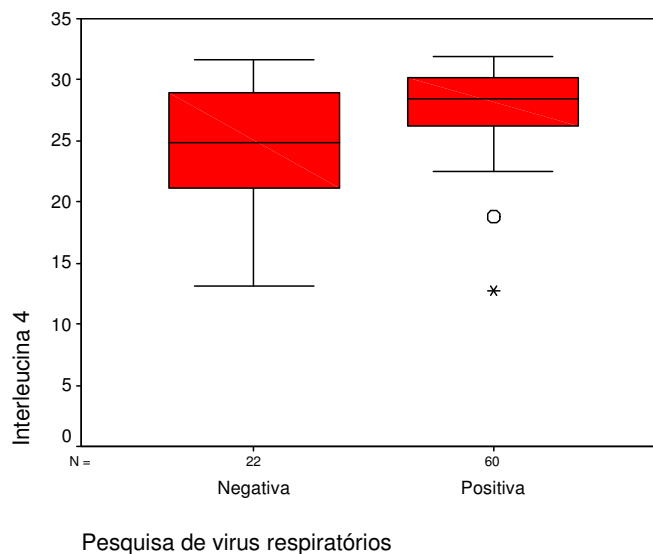


Figura 38: Expressão génica de IL-4, determinada por RT-PCR, consoante houve ou não isolamento de vírus respiratório no primeiro episódio de bronquiolite.

VSR: Da mesma forma, a expressão de IL-4 foi inferior nas crianças com identificação de VSR no primeiro episódio de bronquiolite, o que traduz um **predomínio Th1**.

($p=0,011$)

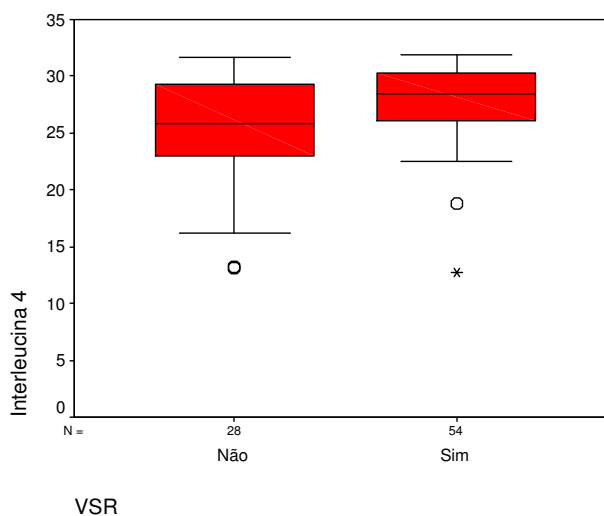


Figura 39: Diferentes expressões de IL-4 entre VSR + e VSR -.

Interleucina 13 (Th2)

Foi detectada menor expressão de IL-13 nas crianças alimentadas com leite materno (**predomínio Th1**).

Pelo contrário, houve maior expressão desta citocina nos doentes com linfocitose ou eosinofilia durante o primeiro episódio de bronquiolite (**predomínio Th2**).

Quadro 17: Análise univariada dos parâmetros com influência sobre a variação de IL-13, com significado estatístico ($p < 0,05$).

PARÂMETRO	SIM	NÃO	ODDS RATIO	IC95%	p
Aleitamento materno	24,017 $\pm$ 3,799	22,731 $\pm$ 2,766	1,1261	1,0010-1,2690	0,049
Linfócitos (coef correlação)	-0,452				0,003
Eosinófilos (coef correlação)	-0,320				0,039

Aleitamento materno:

As crianças alimentadas com leite materno tiveram uma expressão génica de IL-13 significativamente inferior, o que traduziu **predomínio Th1**.

($P=0,049$)

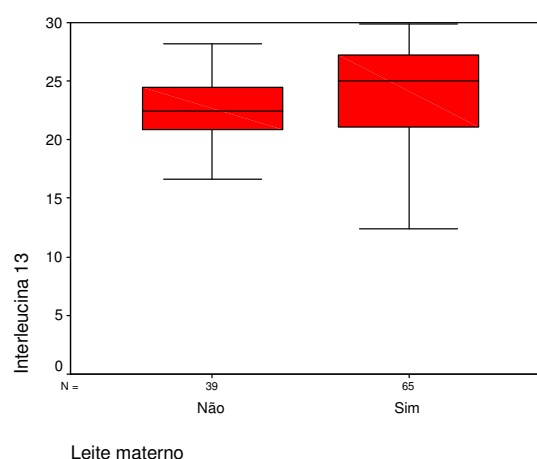
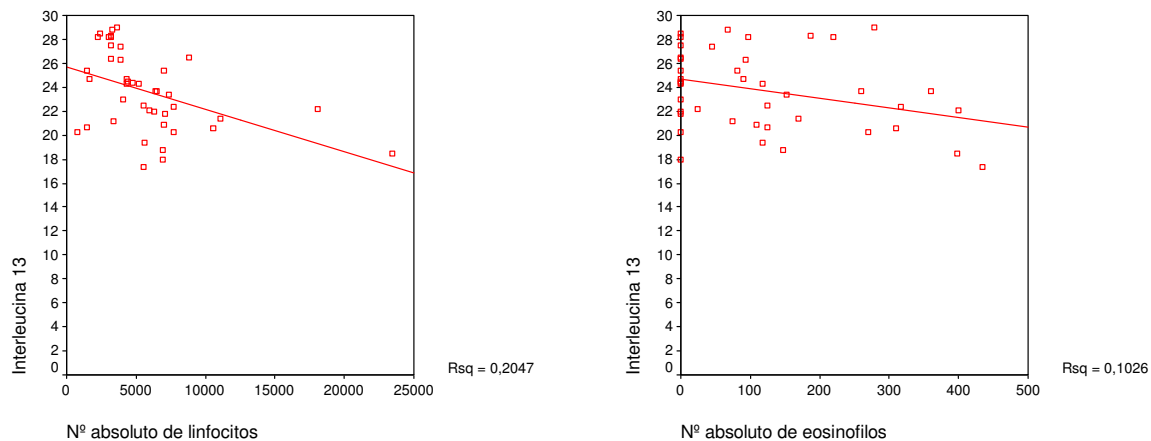


Figura 40: Ciclos de amplificação de IL-13 por RT-PCR, consoante a criança foi ou não alimentada com leite materno.

Linfócitos e eosinófilos:

A expressão de IL-13, nos doentes internados, foi superior nas crianças com maior número absoluto de linfócitos e de eosinófilos, o que aponta para um **predomínio Th2** de ambas as linhas celulares. ($p=0,003$ e $p=0,039$, respectivamente).



Figuras 41 e 42: Gráficos de dispersão, respectivamente, dos números absolutos de linfócitos e eosinófilos no sangue periférico das crianças internadas, em função da expressão de IL-13 na mucosa nasal.

Interleucina 12 (Th1)

A expressão gênica de IL-12 foi mais elevada nas crianças que frequentavam o infantário e naquelas em que, por ocasião do internamento inicial, se comprovou linfocitose (**predomínio Th1**).

Pelo contrário, a referida expressão foi inferior nas crianças expostas ao fumo de tabaco no domicílio e aquelas cujas mães tinham maior escolaridade (**predomínio Th2**).

Quadro 18: Análise univariada dos parâmetros associados à variação de IL-12 (coef=coeficiente).

PARÂMETROS ESTUDADOS	SIM	NÃO	ODDS RATIO	IC95%	p
Escolaridade da mãe (R^2)	0,192				0,038
Tabagismo passivo	20,630 $\pm$ 3,659	18,729 $\pm$ 3,526	1,1587	1,0417-1,2887	0,005
Infantário	18,891 $\pm$ 2,831	21,107 $\pm$ 3,711	0,8104	0,6978-0,9407	0,003
Linfócitos (coef correlação)	-0,427				0,002

Escolaridade da mãe:

A necessidade de amplificação por RT-PCR de IL-12 foi superior nos filhos de mães com maior grau de escolaridade, o que significou que estes tiveram menor expressão gênica desta citocina. Verificou-se, portanto, neste grupo, um **predomínio Th2**.

($p=0,038$).

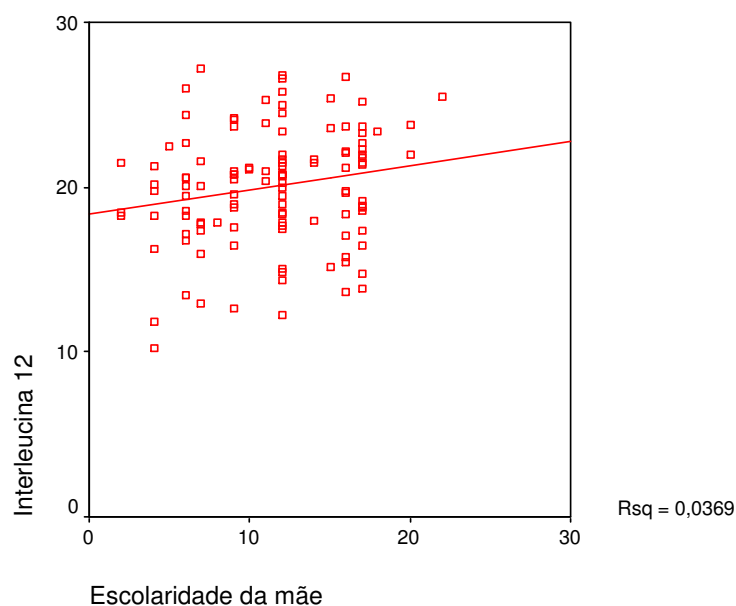


Figura 43: Gráfico de dispersão da expressão de IL-12 na mucosa nasal, em relação com a escolaridade da mãe em anos.

Tabagismo passivo:

Entre as crianças que contactaram com fumo de tabaco no domicílio, houve maior necessidade de amplificação de IL-12 na reacção RT-PCR, sendo a expressão génica original inferior. Houve, assim, um **predomínio Th2** neste grupo de doentes.

($p=0,005$)

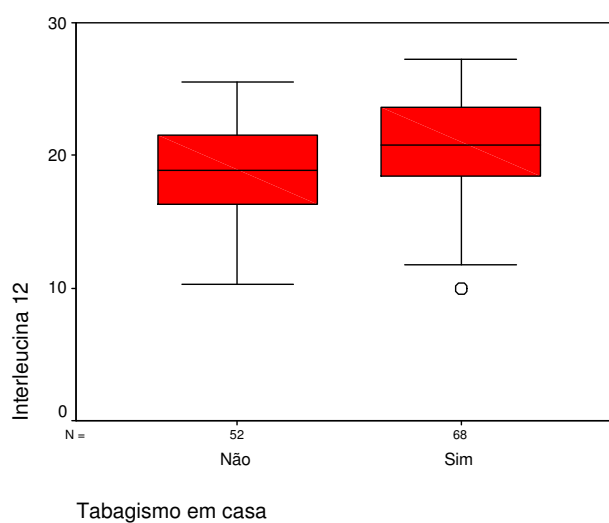


Figura 44: Diferença de expressão de IL-12 na mucosa nasal entre conviventes e não conviventes com fumo de tabaco.

Infantário:

A frequência de infantário associou-se a estimulação de IL-12, pondo em evidência o **predomínio Th1**.

($p=0,003$)

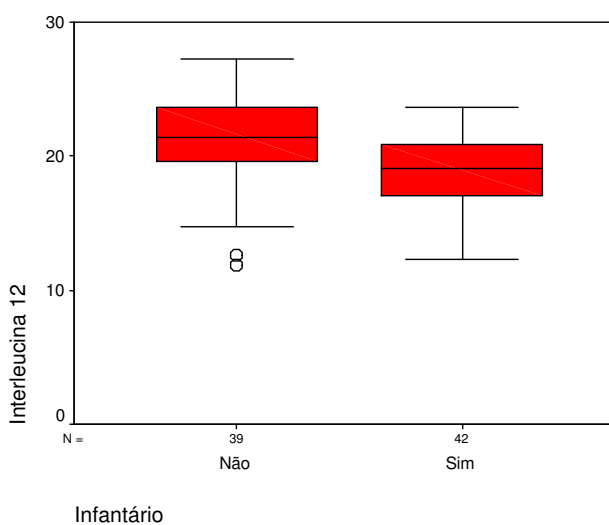
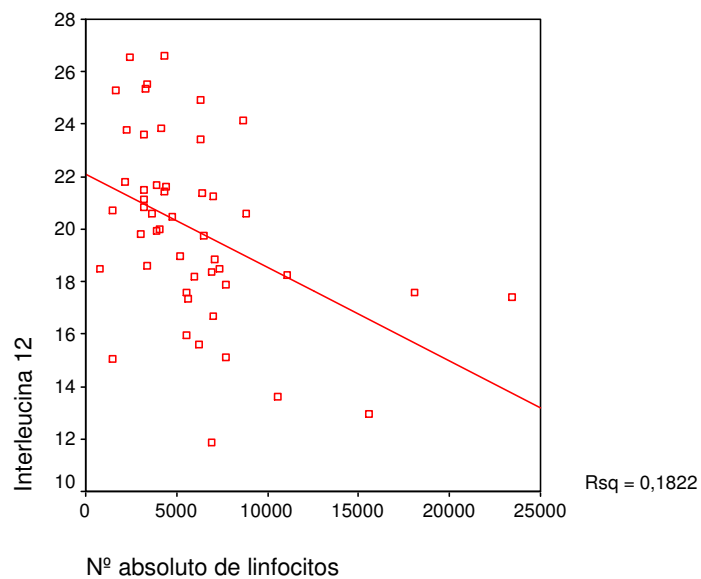


Figura 45: Diferença de expressão de IL-12 na mucosa nasal e frequência de infantário (acima dos 4 meses de idade).

Linfócitos:

Entre os doentes internados, o número de linfócitos foi inversamente proporcional à expressão de IL-12. Demonstra-se, desta forma, um **predomínio Th1.**

($p=0,002$)



Figuras 46: Gráficos de dispersão dos valores totais de linfócitos no sangue periférico das crianças internadas, em função da expressão de IL-12 na mucosa nasal.

Interferão Gama (TH1)

A expressão de IFN- γ foi mais elevada nos lactentes que contactavam com outras crianças, principalmente nos que frequentavam o infantário (**predomínio Th1**).

Pelo contrário, foi encontrada expressão mais baixa desta citocina nos casos em que houve exposição ao fumo de tabaco e naqueles em que o episódio motivou internamento (**predomínio Th2**).

Quadro 19: Análise univariada dos parâmetros com influência sobre a variação de IFN- γ .

PARÂMETROS ESTUDADOS	SIM	NÃO	ODDS RATIO	IC95%	p
Tabagismo passivo	21,646 $\pm$ 4,315	19,351 $\pm$ 3,583	1,1521	1,0471-1,2690	0,003
Infantário	19,341 $\pm$ 3,256	21,095 $\pm$ 4,371	0,8842	0,7831-0,9980	0,042
Contacto com outras crianças	19,475 $\pm$ 3,801	21,755 $\pm$ 4,206	0,8673	0,7880-0,9551	0,002
Internamento	21,651 $\pm$ 4,074	19,996 $\pm$ 4,113	1,1062	1,007-1,2151	0,033

Tabagismo passivo:

A expressão de IFN- γ nas secreções nasais das crianças expostas ao fumo de tabaco no domicílio foi inferior às restantes (**predomínio Th2**).

(p=0,003)

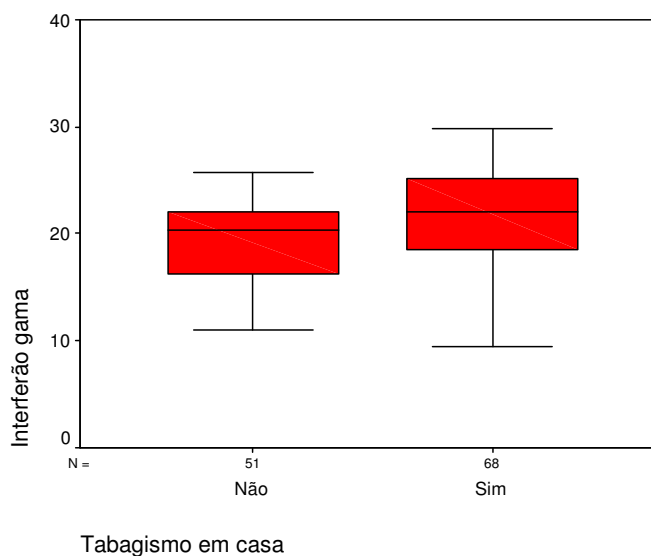


Figura 47: Diferença de expressão de IFN- γ na mucosa nasal entre conviventes e não conviventes com fumo de tabaco.

Infantário e contacto com outras crianças:

No subgrupo de crianças com mais de 4 meses, a frequência de infantário favoreceu o **predomínio Th1**, associando-se a um aumento significativo de IFN- γ ($p=0,042$). Na população em geral, o convívio diário com outras crianças teve efeito semelhante ($p=0,002$).

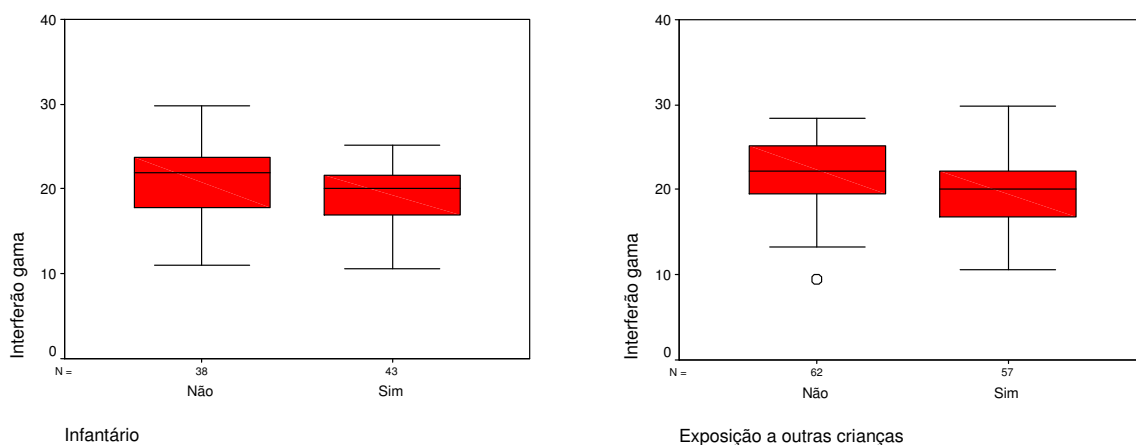


Figura 48 e 49: Diferença de expressão de IFN- γ na mucosa nasal consoante as crianças frequentavam ou não o infantário (após os 4 meses de idade) ou, de forma mais abrangente, se contactavam com outras crianças (amostra total).

Internamento:

Nas crianças internadas no primeiro episódio, foram verificados níveis inferiores de IFN- γ (**predomínio Th2**). ($p=0,033$)

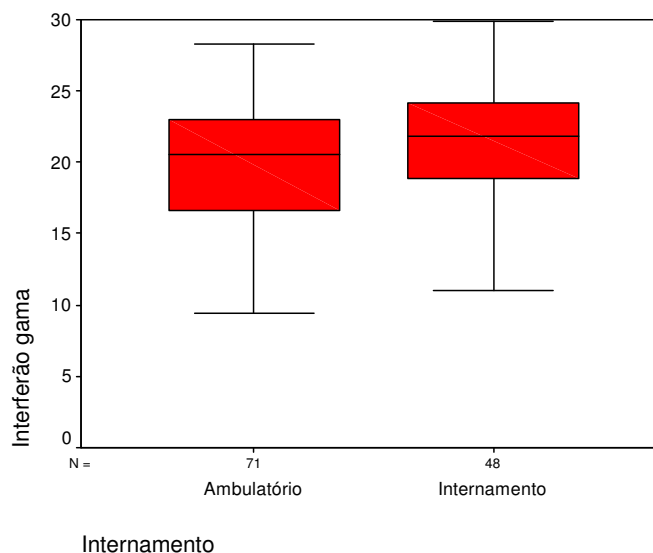


Figura 50: Diferença de expressão de IFN- γ na mucosa nasal entre doentes com bronquiolite internados ou tratados em ambulatório.

Resumo da análise univariada do comportamento das citocinas

No quadro 20 são resumidas todas as relações descritas previamente entre os diferentes parâmetros estudados e a evolução das diversas citocinas, conforme o predomínio Th1 ou Th2 que se detectou nos diferentes casos.

Quadro 20: Determinação do predomínio Th1 ou Th2 associado a cada um dos parâmetros avaliados.

	IL-4	IL-13	IL-12	IFN-γ
Escolaridade da mãe			Th2	
Tabagismo passivo			Th2	Th2
Aleitamento materno		Th1		
Frequência de infantário			Th1	Th1
Exposição a outras crianças				Th1
Internamento				Th2
Vírus	Th1			
VSR	Th1			
Linfócitos		Th2	Th1	
Eosinófilos		Th2		

Em suma, verificou-se

predomínio de citocinas Th1 associado a:

1. alimentação com leite materno
2. convívio diário com outras crianças (infantário ou irmãos)
3. identificação de vírus (VSR ou outro) no primeiro episódio de bronquiolite; e

predomínio de citocinas Th2 associado a

1. escolaridade materna mais elevada
2. tabagismo passivo no domicílio
3. internamento hospitalar no primeiro episódio de bronquiolite aguda
4. eosinofilia durante o internamento

Nas crianças que evoluíram com linfocitose no primeiro episódio de bronquiolite comprovou-se estimulação simultânea de IL-13 (Th2) e IL-12 (Th1), pelo que não foi possível definir um predomínio claro de qualquer das vias.

ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise multivariada foi efectuada para determinar os *odds ratios* (OR) ajustados provenientes do efeito conjunto de todas as variáveis. Foram seleccionados os parâmetros que, na análise univariada, mostraram ter relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com a evolução subsequente para sibilância recorrente por um lado ou, por outro, com o comportamento das citocinas nasais. Desta forma foram minimizados os factores provenientes da interacção entre os diversos factores, identificando-se em definitivo, as variáveis independentes com influência sobre os resultados estudados.

Foram, desta forma, construídos os seguintes modelos multivariados:

1. Parâmetros com influência sobre *sibilância vs não sibilância*
2. Parâmetros com influência sobre o comportamento das citocinas nasais

Parâmetros com influência sobre *sibilância* vs *não sibilância*

Para avaliar a relação *sibilância* vs *não sibilância*, aspecto que constituiu o objectivo primordial do estudo, foram incluídas as variáveis que, no estudo univariado, tinham sido identificadas como estatisticamente relacionadas com o aparecimento de sibilância recorrente: “idade”, “tabagismo durante a gravidez”, “contacto com fumo de tabaco após o nascimento”, “atopia materna”, “febre”, “índice de gravidade” e “isolamento de vírus respiratórios”.

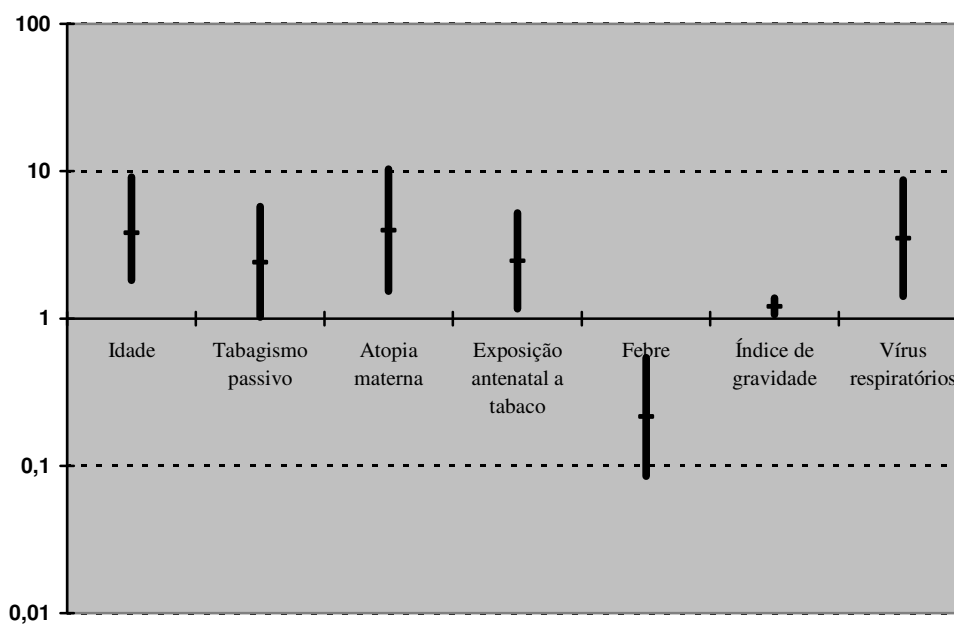
As variáveis “peso actual”, “necessidade de internamento” e “infecção por VSR” não foram consideradas, dado o facto de terem coeficientes de correlação elevados com, respectivamente, as variáveis “idade”, “gravidade” e “isolamento de vírus respiratórios”.

No quadro 21 e na figura 51 é discriminado o resultado da análise multivariada dos parâmetros com influência sobre a recorrência de sibilância após bronquiolite aguda.

Encontrámos associação positiva significativa e independente entre o estado sibilante e os seguintes parâmetros: idade inferior a 6 meses, tabagismo passivo, atopia materna, exposição antenatal a tabaco, índice de gravidade mais elevado e isolamento de vírus respiratórios. A presença de febre no primeiro episódio associou-se de forma inversa ao estado de sibilância recorrente.

Quadro 21: Modelo multivariado dos parâmetros avaliados em relação a sibilância recorrente.

Variável	Odds ratio	IC95%	p
Idade inferior a 6 meses	3,812	1,812-9,099	0,004
Tabagismo passivo	2,400	1,021-5,757	0,048
Atopia materna	3,972	1,533-10,295	0,005
Exposição antenatal a tabaco	2,462	1,163-5,211	0,031
Febre	0,215	0,085-0,543	0,001
Índice de gravidade	1,208	1,065-1,372	0,003
Vírus respiratórios	3,509	1,416-8,696	0,007

Figura 51: Representação gráfica, em escala logarítmica, dos *odds ratio* calculados para cada parâmetro, quanto à evolução para sibilância recorrente.

Parâmetros com influência sobre o comportamento das citocinas

O perfil relativo de cada citocina foi determinado em cada doente. De seguida, esta variável foi classificada de acordo com o predomínio relativo Th1 ou Th2, conforme descrito em Material e Métodos. Os parâmetros que, do ponto de vista estatístico mostraram ter relação significativa com o comportamento de cada citocina foram então incluídos num modelo multivariado, com o objectivo de esclarecer quais os que, de forma independente, mantinham essa relação significativa.

IL-4

Para o estudo do comportamento de IL-4, foi incluída no modelo a variável “vírus respiratórios”, que manteve significado estatístico, com **predomínio Th1** (quadro 22):

Quadro 22: Modelo multivariado da influência dos diversos factores sobre a expressão de IL-4.

Variável	Odds ratio	IC95%	p
Vírus respiratórios	1,196	1,058-1,353	0,013

IL-13

Para o estudo do comportamento de **IL-13**, foram avaliadas as variáveis “aleitamento materno”, “linfócitos” e “eosinófilos”, encontrando-se significado estatístico apenas para a primeira, que continuou a indicar **predomínio Th1** (quadro 23):

Quadro 23: Modelo multivariado da influência dos diversos factores sobre a expressão de IL-13.

Variável	Odds ratio	IC95%	p
Leite materno	6,359	1,180-34,275	0,031
Linfócitos	1,000	0,999-1,000	0,099
Eosinófilos	0,994	0,987-1,002	0,136

IL-12

No caso da expressão do gene de **IL-12**, foram consideradas as seguintes variáveis “escolaridade da mãe”, “tabagismo passivo”, “frequência de infantário” e “número de linfócitos”. Não conseguimos identificar nenhuma associação com significado estatístico (quadro 24):

Quadro 24: Modelo multivariado da influência dos diversos factores sobre a expressão de IL-12.

Variável	Odds ratio	IC95%	p
Escolaridade da mãe	0,996	0,781-1,269	0,973
Tabagismo passivo	3,100	0,374-25,684	0,294
Infantário	5,276	0,472-58,997	0,177
Linfócitos	1,000	1,000-1,001	0,055

IFN- γ

Para a expressão génica de **IFN- γ** , foram estudadas as variáveis “tabagismo passivo”, “exposição a outras crianças” e “necessidade de internamento”. As duas primeiras tiveram significado estatístico, com **predomínio Th1** (quadro 25):

Quadro 25: Modelo multivariado da influência dos diversos factores sobre a expressão de IFN- γ .

Variável	Odds ratio	IC95%	p
Tabagismo passivo	0,432	0,214-0,949	0,041
Exposição a outras crianças	3,050	1,427-6,517	0,004
Internamento	0,832	0,632-1,032	0,054

Resumo da análise multivariada do comportamento das citocinas

No quadro 26 e figura 52 são resumidos os resultados apresentados nos anteriores quadros 22 a 25, nomeadamente os *odds ratio* e respectivos intervalos de confiança obtidos para o predomínio Th1 ou Th2.

As seguintes variáveis que, no modelo univariado, tinham significado estatístico quanto à avaliação do tipo de predomínio Th1 ou Th2 das citocinas da superfície da mucosa nasal, revelaram-se não significativas no modelo multivariado: “escolaridade da mãe”, “necessidade de internamento”, “número de linfócitos” e “número de eosinófilos”.

Quadro 26: Resumo das diferentes variáveis com significado estatístico no modelo multivariado, conforme o sentido em que direccionam a sua acção (predomínio Th1 ou Th2).

VARIÁVEL	Citocina	Odds ratio (IC95%)	
		Th1	Th2
Tabagismo passivo	IFN- γ		2,315 (1,054-4,673)
Contacto com outras crianças	IFN- γ	3,050 (1,427-6,517)	
Aleitamento materno	IL-13	1,196 (1,058-1,353)	
Vírus respiratórios	IL-4	4,004 (1,343-11,939)	

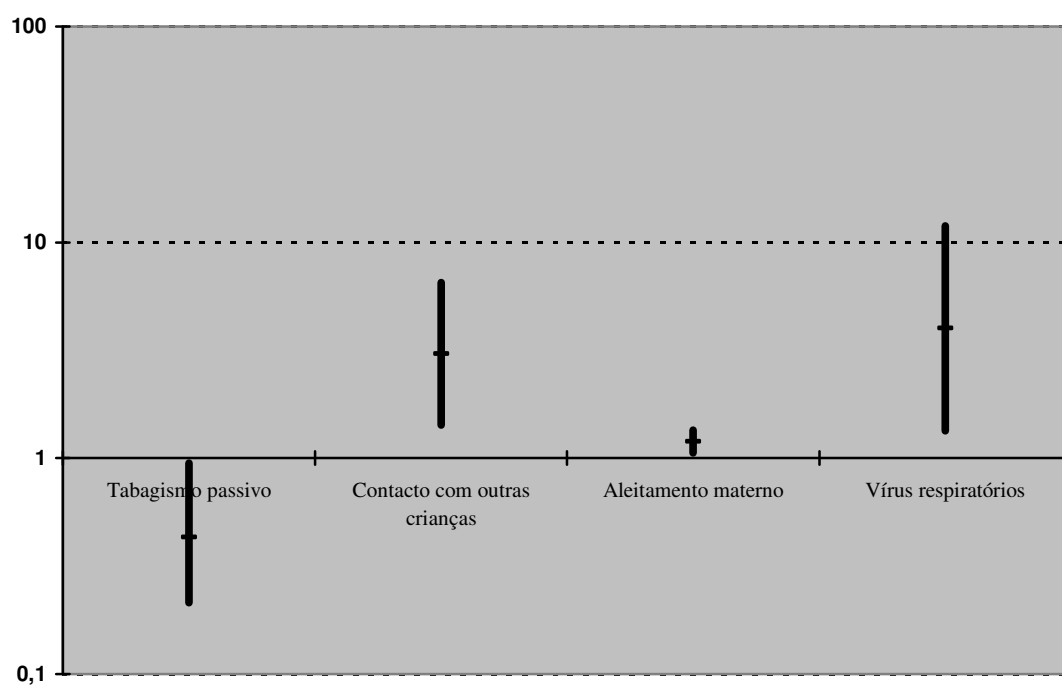


Figura 52: Representação gráfica, em escala logarítmica, dos *odds ratio* dos diversos parâmetros com influência estatisticamente significativa sobre o predomínio da imunidade de tipo Th1.

Para finalizar, esquematizamos na figura 53 o efeito integrado dos diferentes parâmetros sobre a recorrência de sibilância após um primeiro episódio de bronquiolite aguda e, em paralelo, sobre o comportamento das citocinas da mucosa nasal.

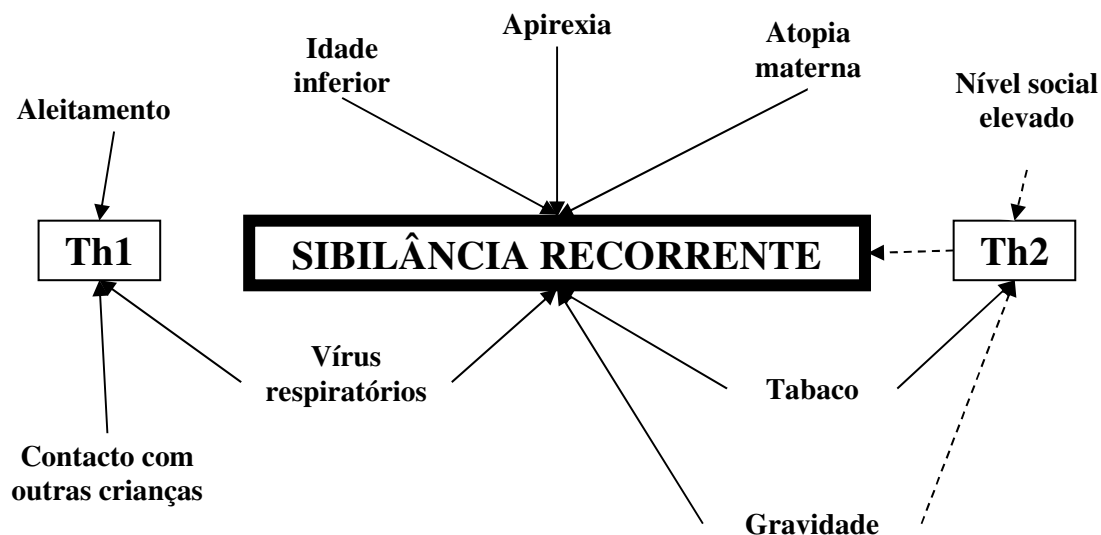


Figura 53: Representação gráfica da influência dos diversos parâmetros sobre a recorrência de sibilância após primeiro episódio de bronquiolite e, em paralelo, sobre o comportamento das citocinas à superfície da mucosa nasal (a tracejado encontram-se os factores significativos no modelo univariado mas não na análise multivariada).

DISCUSSÃO

DA IMPORTÂNCIA E ACTUALIDADE DO TEMA

A sibilância transitória do lactente é uma entidade patológica não completamente esclarecida. Apesar de evoluir de forma favorável ao longo de meses a anos, a sua elevada prevalência e necessidade frequente de cuidados médicos motiva preocupação e custos elevados nas famílias e na sociedade (Martinez 1995, Bont 2000, Lemanske 2002, Korppi 2004, Mallol 2005). Para a patogénese da sibilância transitória do lactente contribuem factores genéticos, imunológicos, ambientais ou inerentes ao desenvolvimento do sistema respiratório (Cifuentes 2003, Henderson 2005, de Meer 2005, Obihara 2005, Eder 2006, Pattenden 2006, Morais-Almeida 2006, Lannerö 2006, Lemanske 2006, Landau 2006, Arora 2006, Asher 2006, Schaub 2006, Gern 2006, Videira 2006, Prescott 2006, Redd 2006, Zeldin 2006, Graham 2006, Ly 2006, Carroll 2007, Lee 2007, Singh 2007, Ramsey 2007).

Antes do início desta investigação efectuámos uma pesquisa bibliográfica exaustiva, na qual identificámos diversos factores de risco para o aparecimento e perpetuação da sibilância recorrente nos lactentes. A maioria desses estudos incidiu sobre em coortes de crianças filhas de pais atópicos, com recrutamento efectuado durante a gravidez e acompanhamento contínuo até algumas idades-chave (idade escolar, adolescência, início da idade adulta).

O exemplo mais importante deste tipo de investigações é o Estudo Respiratório Infantil de Tucson (TCRS - Tucson Children's Respiratory Study). Trata-se de um estudo de coorte iniciado em 1980 que incluiu, no momento do nascimento, 1246 indivíduos e respectivas famílias, com a finalidade de detectar factores de risco para o aparecimento de doenças respiratórias durante a infância. Entre outros resultados, o estudo permitiu:

- 1) Descrever o fenótipo das várias doenças sibilantes da infância (transitória, não atópica, atópica) e as suas características (Taussig 2003)

- 2) Desenvolver um índice preditivo de asma aos três anos de idade (Castro-Rodriguez 2000)
- 3) Esclarecer o efeito do convívio diário com outras crianças sobre as doenças sibilantes da criança: nos primeiros anos de vida, comprovou-se que contribuiria para uma maior expressão dessa manifestação clínica, dado o risco de contágio vírico; mais tarde, conferiria protecção em relação à asma brônquica (Ball 2000). Este comportamento foi atribuído à estimulação inicial, pelas infecções, dos linfócitos Th1, associada à inibição da resposta de tipo Th2, responsável pela atopia (Guerra 2004, Martinez 2005).
- 4) Delinear o efeito tardio da infecção por VSR na infância, bem como a sua influência sobre as diferentes citocinas de expressão Th1 ou Th2. O défice prévio de IFN- γ contribuiria para recorrência de sibilância (Guerra 2004).

Um outro estudo multicêntrico de coorte, iniciado em 1998, incluiu investigação epidemiológica e laboratorial, com o objectivo de esclarecer a importância relativa de factores genéticos e ambientais na origem das doenças sibilantes da infância. Trata-se do COAST (Childhood Origins of ASThma), em que foram seguidos, aos três anos de idade, 287 indivíduos com antecedentes familiares de atopia. Foi possível determinar:

1. As diferentes respostas imunitárias às infecções virais, nomeadamente a existência prévia de predomínio Th2 nalgumas crianças com sibilância recorrente (Copenhaver 2004, Friedlander 2005, Gern 2006).
2. O perfil das citocinas na evolução das doenças sibilantes da infância, designadamente o facto de não obedecerem estritamente a um padrão estrito de polarização Th1 ou Th2 (Friedlander 2005, Gern 2006, Singh 2007).
3. A previsão de risco de sibilância a partir dos perfis de citocinas determinados no cordão umbilical (Neaville 2004, Lewis 2006, Schaub 2006).

O Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância (ISAAC) é uma investigação epidemiológica prospectiva de âmbito mundial, que se iniciou em 1991, com o objectivo de acompanhar a evolução da prevalência das doenças alérgicas. Foram avaliadas mais de 700.000 crianças em 56 países, sendo compilados dados ambientais, clínicos, imunológicos e genéticos (Mitchell 2002, Nunes 2005, Asher 2006). Outra investigação de relevo, de âmbito europeu, foi o German Multicentre Allergy Study (MAS), que estudou uma coorte de 1314 recém-nascidos com risco de atopia, a fim de

definir factores de risco para asma (Kulig 1999, Illi 2001, Lau 2002). Permitiu estabelecer a noção de “marcha alérgica”, esclarecer a influência do fumo de tabaco sobre o início e perpetuação das doenças sibilantes e conhecer o papel das infecções e da poluição atmosférica sobre a sensibilização alérgica.

Em Portugal, além da participação de vários centros no estudo ISAAC, destaca-se o estudo estudo prospectivo de Morais de Almeida e Rosado Pinto, que incluiu 308 crianças com sibilância recorrente e idade compreendida entre os 6 meses e os seis anos. Estas crianças foram seguidas ao longo de 8 anos, com avaliação clínica, determinação de IgE, testes de picada e espirometria. A prevalência de atopia aumentou de 48% em 1993 para 75% em 2001; foram definidos factores de risco para asma em idade escolar (asma parental, rinite alérgica, eczema atópico, sensibilização alérgica e início dos sintomas antes dos dois anos de idade); a frequência de infantário no primeiro ano de vida associou-se a diminuição ulterior da prevalência de asma (Gaspar 2002, Nunes 2005, Morais-Almeida 2007). Inácio (2005), Borrego (2005), Videira (2007) e outros têm estudado a genética da asma na população portuguesa e a função respiratória em crianças abaixo dos cinco anos. Rebordão (2005) e Inácio (2006) têm publicado investigação sobre o paradigma Th1 / Th2 no sangue periférico de doentes asmáticos.

O Copenhagen Prospective Study on Asthma in Childhood (COPSAC) iniciou-se em 1998, incluindo uma coorte de 411 filhos de mães asmáticas, com o objectivo de investigar a relação entre factores genéticos e ambientais nessa doença. Foi demonstrada a influência de poluentes e alergénios e sintomatologia respiratória, bem como a eficácia dos corticosteróides inalados e do montelucaste na terapêutica da sibilância precoce em lactentes (Nielsen 2006, Bisgaard 2006, Bisgaard 2006, Stensballe 2006).

Outros estudos de menor dimensão ilustram a importância do tema. Heaton (2005) determinou a associação entre hiperreactividade brônquica e aumento de produção de citocinas Th2 (IL-13 e IL-4), mesmo em crianças sem atopia demonstrável. Tripp (2005) e Pinto (2006) encontraram aumento simultâneo de actividade Th1 e Th2 em situações semelhantes, sugerindo a existência de relações imunes menos lineares. Henderson (2005) estudou 150 doentes, avaliando a incidência ulterior de atopia e sibilância em crianças hospitalizadas por bronquiolite VSR + no primeiro ano de vida. Aos sete anos de idade detectou maior incidência de sibilância recorrente nesses

doentes, mesmo na ausência de sensibilização atópica. Korppi (2004) concluiu que a infecção por VSR no primeiro ano de vida constituía um factor de risco independente para alteração da função pulmonar, independentemente da tradução clínica. Pelo contrário, Nafstad (2005) verificou, que as infecções respiratórias precoces aumentavam o risco de sibilância aos 10 anos de idade. Garcuño (2003) verificou que o consumo de tabaco pela mãe durante a gravidez aumentava em 2,5 vezes o risco de sibilância recorrente, enquanto o contacto pós-natal com fumo de tabaco e o aleitamento materno não tiveram influência sobre o aparecimento desse tipo de manifestações clínicas. Cifuentes (2003) notou que maior risco de sibilância recorrente após um primeiro episódio de bronquiolite VSR + em relação aos casos VSR -, principalmente nas situações em que as manifestações clínicas tinham sido mais graves. Kelley (2005), verificou que a sibilância precoce transitória se associou ao tabagismo materno e à alteração prévia de função respiratória; a sibilância persistente à frequência de infantário e provas funcionais respiratórias normais e a sibilância de início tardio à atopia e sensibilização a aeroalergéneos. Ramsey (2007) descreveu que a bronquiolite por VSR no primeiro ano de vida aumentaria o risco de asma brônquica na idade escolar, ao contrário de outras infecções respiratórias (otite, laringite) que diminuíram esse risco.

Estes estudos, com diferentes dimensões e critérios, demonstram a actualidade e importância do tema desta dissertação, contribuindo para o esclarecimento da história natural das doenças sibilantes da primeira infância e dos respectivos factores de risco, e permitindo conhecer a fisiopatologia destas situações. Outros estudos de menor dimensão foram efectuados em grupos de doentes (Koopman 2003, Guerra 2004, Giugno 2004, Garofalo 2004, Mallol 2005, Pitrez 2005, Heaton 2005, van Benten 2005, Oh 2006, Paricio-Telareyo 2006, Midulla 2006, Tryen 2006, Puthothu 2006, Stensballe 2006, Carroll 2007, Bennett 2007, Chung 2007), culturas celulares (Joshi 2003, Noakes 2003, McNamara 2003, Neaville 2004, Schauer 2004, Laham 2004, Braciale 2005, Pinto 2006, MacLennan 2006, Ly 2007) ou modelos animais (Boelen 2002, Barrett 2002, Stokes-Peebles 2005, Phaybouth 2006), debruçando-se de forma parcelar sobre cada um dos factores de risco ou esclarecendo os mecanismos imunológicos, citoquímicos e ultrastruturais subjacentes a estas patologias.

Em suma, todos os estudos referidos, realizados em centros de investigação de prestígio, chamam a atenção para a importância do tema que nos propusemos estudar. É de referir,

igualmente, que a ciência médica atingiu limiar da era da medicina preditiva, paradigma da maior actualidade, no qual esta investigação se insere.

DAS IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

O presente estudo pode ter relevância na prática clínica diária, na medida em que contribuiu para conhecer melhor as características dos lactentes com maior risco de recorrência de sibilância após um primeiro episódio de bronquiolite. A identificação mais precoce dos respectivos factores de risco pode permitir a adopção de medidas preventivas, aumentando a qualidade do aconselhamento médico e melhorando o bem-estar das crianças e suas famílias.

Admitimos que o comportamento das diversas citocinas a nível das vias aéreas superiores traduza fenómenos que ocorrem em segmentos mais distais das vias aéreas. O seu conhecimento poderá contribuir para esclarecer as complexas interrelações imunológicas existentes a esse nível (Bont 2001, Till 2001, Bergoin 2002, van Benten 2005, Pitrez 2005, Midulla 2006).

O paradigma Th1 / Th2 no ambiente imunológico do aparelho respiratório no momento de um primeiro episódio de bronquiolite pode correlacionar-se, nalguns casos, com a recorrência da sibilância infantil. O conhecimento da influência que os diferentes tipos de ambiente epidemiológico e clínico exercem sobre a expressão das citocinas na mucosa respiratória poderá tornar possível uma melhor previsão da evolução clínica dos doentes, proporcionando uma maior eficácia das medidas preventivas e terapêuticas.

DAS LIMITAÇÕES DO PRESENTE ESTUDO

Na realização deste estudo existiram algumas dificuldades que limitaram a concretização de alguns dos seus objectivos e, necessariamente, os resultados:

O tempo de realização do estudo foi limitado, sendo a dimensão da amostra a considerada suficiente para, dentro das limitações orçamentais, poder concluir o estudo. Um período mais alargado de recrutamento de doentes ou, eventualmente, o seu prolongamento por um segundo inverno, poderia aumentar a robustez dos resultados obtidos.

O facto de os dados terem sido, no momento inicial, recolhidos por diferentes médicos da equipa poderá condicionar algum enviesamento, relacionado com a subjectividade da prática médica. Tentámos reduzi-la ao mínimo, em reuniões periódicas da equipa, com o objectivo de uniformizar critérios e estratégias adoptadas à medida em que decorria o estudo.

A reavaliação das crianças por via telefónica foi adequada nos casos em que não se verificaram novos episódios de sibilância. No entanto, no escasso número dos classificados como sibilantes apenas reavaliados telefonicamente, o esclarecimento da gravidade da patologia e a exclusão de causas orgânicas podem não ser absolutas.

Seria importante utilizar um método laboratorial com capacidade de identificação de Metapneumovírus humano. Trata-se de um agente muito frequente de bronquiolite aguda, que poderá ter sido responsável por uma percentagem importante dos casos estudados. A evolução ulterior destas crianças e o comportamento das citocinas nasais nesses casos poderia ser interessante.

Um estudo mais exaustivo das citocinas, nomeadamente através do isolamento e identificação das diferentes populações celulares responsáveis pela sua síntese, poderia proporcionar informação mais detalhada que a que obtida neste estudo. Seria, no entanto, necessária maior diferenciação, por parte dos investigadores envolvidos, quanto a procedimentos laboratoriais, aspecto ainda não exequível no presente.

Ao longo do seguimento, poderia ser mais informativo avaliar a gravidade e o grau de sibilância recorrente em cada doente, estratificando-os por de acordo com o grau de gravidade da sua situação. As crianças com sibilância recorrente evoluem de forma

heterogenia, pelo que a informação resultante de uma análise desse tipo poderia ser interessante. Não foi, no entanto, essa a opção tomada no decorrer desta investigação. Seria necessário estudar um maior grupo de crianças para retirar conclusões com significado.

DA METODOLOGIA

A presente investigação foi idealizada como um estudo de coorte. O primeiro passo consistiu na definição de uma amostra de doentes, subsequentemente acompanhada ao longo de um determinado período, com a finalidade de estudar a sua evolução clínica.

De acordo com os critérios propostos por Norman (2000), a dimensão da amostra (150 crianças) pode considerar-se adequada para retirar conclusões válidas do ponto de vista estatístico. Atendendo à prevalência da sibilância recorrente após bronquiolite, estimada em 50%, uma amostra de 60 crianças permitiria a realização do estudo. É, pois, legítimo afirmar que o número de casos recrutados é representativo da população estudada.

As crianças foram incluídas no estudo ao recorrerem ao serviço de urgência pediátrica do HSFx (hospital central), por ocasião de um primeiro episódio de sibilância. A população base é muito heterogénea do ponto de vista socioeconómico e cultural, o que reflecte as características da comunidade em que o hospital se encontra inserido. O tipo de organização actual dos serviços de saúde permite, por outro lado, que as famílias recorram a serviços de urgência pediátrica por iniciativa própria, sem referenciação. Esta circunstância leva a que a amostra avaliada neste estudo represente, muito provavelmente, a apresentação clínica da generalidade dos casos de bronquiolite aguda na comunidade e não apenas a dos casos mais graves, o que seria expectável em meio hospitalar.

A investigação teve início no momento do episódio inaugural de bronquiolite aguda e não no momento do nascimento, metodologia utilizada nas investigações publicadas por autores como, entre outros, Martinez (1995), Illi (2001), Lau (2002), Neaville (2004), Wright (2004), Brussee (2005), Nafstad (2005), Matsumata (2005), Arora (2006), Asher (2006), Lemanske (2006), Ly (2006), Uekert (2006), Bisgaard (2007), Piippo-Savolainen (2008) e Epton (2007). O nosso objectivo consistiu em identificar os diferentes comportamentos clínicos das crianças após um primeiro episódio de bronquiolite aguda, e não determinar a probabilidade de aparecimento ulterior de

manifestações clínicas num grupo previamente identificado como tendo maior risco de doença atópica. Procurámos, desta forma, identificar parâmetros associados ao aparecimento de sibilância recorrente numa população de lactentes que, à partida, não manifestavam qualquer factor predisponente.

A inclusão das crianças foi efectuada no serviço de urgência. Com a finalidade de recrutamento do maior número de doentes e de distribuição aleatória por todos os dias da semana, contámos com a colaboração de vários médicos, integrados nas equipas de urgência dos diversos dias da semana. É possível admitir que os critérios utilizados por cada médico tenham implicado certo grau de subjectividade inerente à prática clínica. Tentámos reduzir ao mínimo esse possível condicionalismo em reuniões periódicas do grupo de trabalho e pela revisão exaustiva, pelo investigador principal, de todos os processos clínicos e questionários.

Os doentes internados foram acompanhados clinicamente, durante esse período, pelo investigador principal.

No que diz respeito aos doentes que tiveram alta após a observação no serviço de urgência, e cujo primeiro episódio de bronquiolite decorreu em ambulatório, é também de admitir a existência de algumas diferenças, entre os vários colaboradores, quanto aos critérios de observação e orientação. Este aspecto mereceu a nossa atenção ao longo do tempo do estudo, através da concretização de reuniões periódicas para garantir da uniformização, dos procedimentos adoptados.

A patologia que estudámos foi definida, predominantemente, por critérios de exclusão. Considerámos que uma criança teria sibilância recorrente apenas se tivessem sido excluídas as entidades nosológicas anatómicas, funcionais ou imunológicas enumeradas no quadro 1. Como tal, os doentes foram incluídos no estudo após o primeiro episódio de sibilância, apenas se nenhuma dessas etiologias fosse evidente e se, concomitantemente, não existissem antecedentes de prematuridade ou de doença crónica. Uma vez que os corticosteróides poderiam modificar as respostas imunes que pretendíamos estudar, excluímos igualmente, logo no primeiro contacto, os doentes que tivessem sido medicados com esses fármacos por via sistémica ou inalatória nas duas semanas precedentes.

Ao longo das várias observações em consulta, para respeitar os critérios pré-definidos, foram igualmente excluídos os doentes em que, ao longo do tempo foram comprovadas as entidades enumeradas.

O seguimento das crianças foi efectuado em consulta hospitalar de pneumologia pediátrica, proposta a todos os doentes incluídos no estudo. A observação clínica neste contexto foi, mais uma vez e em todos os casos, efectuada pelo investigador principal, a fim de uniformizar as características dos dados colhidos e critérios utilizados. Todos os exames necessários para o esclarecimento da situação clínica foram efectuados no HSFX, de acordo com critérios clínicos e boas práticas médicas.

Consideramos que a frequência trimestral de consultas foi a adequada ao seguimento clínico, nomeadamente para evitar falhas de memória por parte das famílias, acerca do número e gravidade das crises de sibilância e da terapêutica efectuada.

A medicação de fundo indicada neste escalão etário não se encontrava, no período de realização deste estudo, bem definida. Sempre que considerado necessário, pelo número e gravidade das crises, adaptámos as recomendações propostas pelo grupo GINA (2006), incluindo a prescrição de corticosteróides inalados ou modificadores orais dos leucotrienos.

A reavaliação por via telefónica foi a solução que nos pareceu adequada para a obtenção de informações acerca das crianças que não compareceram à consulta. Esta metodologia, de elevada confiabilidade no caso das crianças não sibilantes, foi aplicada com periodicidade trimestral, através de um questionário uniforme, que incidiu sobre o número, gravidade, frequência e terapêuticas das crises, terapêutica de fundo, recurso a consultas de urgência e necessidade de internamentos hospitalares (Chong-Neto 2007). A classificação das crianças como sibilantes foi igualmente possível; quanto à avaliação da gravidade da situação, admitimos que este procedimento possa ter sido mais falível. Os familiares foram igualmente interrogados sobre o seguimento efectuado pelos médicos assistentes, eventuais investigações complementares efectuadas e seus resultados. A exclusão das crianças do grupo avaliado por via telefónica seguiu critérios

semelhantes aos usados nos doentes observados com regularidade na consulta hospitalar.

No respeitante à recolha desta informação é possível que se tenha verificado menor grau de rigor. No entanto, na sociedade contemporânea, dado o papel preponderante desempenhado pelas telecomunicações em inúmeros aspectos da vida quotidiana e da própria prática clínica, aceitamos que os dados obtidos telefonicamente tenham tido validade comparável aos obtidos pessoalmente. Noutros estudos, Bowling (2005) considerou a qualidade da informação recolhida por via telefónica semelhante à obtida presencialmente e Kempf (2007) valorizou de forma clara a comunicação telefónica na recolha de dados em investigação clínica. Tal como nós, autores como Castro-Rodriguez (2000), Ball (2000), Sherriff (2001), Cifuentes (2003), Garcuño (2003), Gern (2004), Stensballe (2006), Ly (2006), Lazzaro (2007), Ramsey (2007) e Bisgaard (2007), entre outros, incluíram dados colhidos dessa forma, sem que se verificasse diminuição da sua fiabilidade.

Sublinhamos igualmente que, no caso das crianças não sibilantes, não era eticamente defensável exigir a deslocação de uma criança e da sua família a um hospital, durante o horário habitual de trabalho, se a situação clínica o não justificasse. Esta consulta desnecessária poderia ter diversas consequências socioprofissionais, o que não seria justificável nem desejável.

O principal objectivo deste estudo foi a pesquisa de parâmetros associados a maior probabilidade de evolução para sibilância recorrente, após uma primeira bronquiolite ocorrida até aos 24 meses de idade. Deste modo, a escolha das variáveis a investigar resultou de uma pesquisa bibliográfica prévia e exaustiva sobre factores de risco associados à sibilância recorrente.

Elementos como a idade, sexo, raça, classe social, número de coabitantes, existência de irmãos, frequência de infantário, aleitamento materno, atopia no próprio ou em familiares, contacto com tabaco, contacto com animais domésticos, gravidade do primeiro episódio, estirpe vírica isolada, têm sido amplamente estudados, embora com resultados por vezes contraditórios. As outras variáveis que considerámos importantes resultaram da nossa experiência clínica, que nos levou a equacionar a influência de

outros elementos na evolução das crianças após uma primeira bronquiolite. Destes, considerámos importante conhecer, nomeadamente, alguns determinantes do paradigma Th1/Th2, que detectámos de forma não invasiva no decorrer do episódio inicial.

A definição da data da primeira bronquiolite de acordo com a divisão do ano em semanas epidémicas (Centers for Disease Control and Prevention e Organização Mundial de Saúde) é uma forma universalmente aceite de datar e acompanhar a evolução de epidemias (CDC 2007). Neste estudo a sua utilização justifica-se, uma vez que a etiologia da bronquiolite aguda é predominantemente vírica, tendo em conta os agentes etiológicos e a sazonalidade desta entidade clínica.

O nível mais elevado de escolaridade atingido por um dos progenitores é um critério representativo do nível sócio-económico da família em que cada criança está integrada, conforme demonstrado por diversos investigadores como Mielck (1996), Klinnert (2001), du Prel (2006) e Pawliska-Chmara (2007). A escala de Graffar adaptada à realidade portuguesa, comum noutros estudos, é considerado por alguns um método antigo, desactualizado, pouco objectivo e que necessita, para uma classificação adequada, da formulação de um excessivo número de questões. É provável que outros métodos de estratificação social, oriundos das ciências sociais e políticas, permitam uma melhor classificação das famílias. No entanto, o que foi utilizado é um método bastante objectivo e de fácil colheita, correlacionável, mesmo intuitivamente, com as condições de vida das famílias em que as crianças se incluem (du Prel 2006, Pawliska-Chmara 2007).

Definimos tabagismo passivo como o contacto domiciliário, por parte das crianças, com fumo de tabaco, independentemente das condições e tipo de consumo tabágico praticado pelos familiares. Metodologia semelhante, baseada em questionários aos pais, foi utilizada por autores como Garcuño (2003), Taussig (2003), Bradley (2005), Pitrez (2005), Feleszko (2006), Chong-Neto (2007) ou Morais-Almeida (2007). As crianças que estudámos, pelo seu escalão etário, poderão ser influenciadas por baixas concentrações de fumo de tabaco, presente em roupas ou noutros objectos. Como tal, assumimos existir contacto significativo das crianças com fumo de tabaco mesmo nos casos em que os pais garantiam não fumar em casa. Seria eventualmente mais informativo quantificar a nicotina absorvida, através de doseamentos de cotinina sérica

das crianças, como efectuado por, entre outros autores, Noakes (2003) ou Kelley (2006). Trata-se poi de um tópico de investigação a desenvolver no futuro.

Os hábitos tabágicos da mãe durante a gravidez foram considerados como presentes ou ausentes, independentemente do tipo e quantidades consumidas. Para o estudo deste factor de risco poderia ser útil quantificá-lo de forma mais pormenorizada. É consensual, no entanto, que mesmo pequenas concentrações de nicotina a nível fetoplacentar poderão influenciar o desenvolvimento estrutural e funcional do aparelho respiratório fetal, como demonstrado por Martinez (1995), Gern (1999), Stick (2000), Sherriff (2001), Bracken (2002), Barrett (2002), Garcuño (2003), Noakes (2003), Janson (2004), Bradley (2005), Landau (2006), Le Soeuf (2006), Pattenden (2006), Morais-Almeida (2006) ou Lannerö (2006).

Considerando a composição do leite humano, é possível que alguns benefícios imunológicos do aleitamento materno possam ser obtidos mesmo nos casos em que se verifica aleitamento misto durante os primeiros meses de vida. No entanto, para melhor objectivar essa variável, incluímos no grupo de crianças alimentadas com leite materno apenas os casos em que este foi referido, em exclusivo, até aos três meses de idade (Taussig 2003, Wright 2004, Wills-Karp 2004, de Silva 2004, Kull 2005, Obihara 2005, Friedman 2005, Vercelli 2006, Liu 2006, Chantry 2006, Schaub 2006, Prescott 2006, Paricio-Talayero 2006, Lee 2007, Bryan 2007, Piippo-Savolainen 2008).

Em relação à frequência diurna de espaços comuns (creches, infantários ou amas com mais de seis crianças), apenas a considerámos após os quatro meses de idade, no pressuposto de que a generalidade da população beneficiaria da legislação em vigor, que permite a estadia da crianças com a mãe até essa idade. Algumas crianças incluídas no estudo poderão ter frequentado espaços comuns ainda antes de atingirem essa idade, o que poderá repercutir-se na evolução da sua sintomatologia respiratória.

Em relação às variáveis clínicas estudadas, cabe referir que os antecedentes pessoais e familiares de atopia foram considerados apenas nos casos em que havia diagnóstico prévio. É do conhecimento geral que alguns sintomas são atribuídos de forma errónea, por parte das famílias, a fenómenos alérgicos. Desta forma, somente foram consideradas as informações de “alergia alimentar” ou “medicamentosa”, “asma” ou “eczema”, entre

outras, baseadas numa observação clínica prévia. Esta estratégia teve o propósito de tentar diminuir os falsos positivos associados a esta variável.

A classificação da gravidade do episódio inicial de sibilância foi atribuída pelo médico que observou a criança no serviço de urgência e, posteriormente, confirmada pelo investigador principal. Adaptámos para este estudo o índice de gravidade da bronquiolite desenvolvido por Wang e colaboradores em 1992, por nos parecer objectivo e baseado em critérios clínicos simples. O mesmo obrigou à observação e registo atento e sistemático de cinco dados importantes da observação clínica (frequência respiratória, presença de tiragem, dados da auscultação pulmonar, quantificação do estado geral e cor da pele), bem como um dado complementar (SpO_2), disponível e acessível em todos os serviços de urgência pediátrica. Tal critério de pontuação permitiu quantificar dados frequentemente baseados em critérios intuitivos. O cuidado colocado na observação clínica foi, desta forma, útil para os doentes. Por outro lado, entendemos ser legítimo afirmar, pela objectividade dos parâmetros utilizados, que a utilização desse índice de gravidade é susceptível de aumentar a reprodutibilidade deste estudo.

A necessidade de internamento baseou-se na gravidade clínica da bronquiolite, sendo nalguns casos, ditada por aspectos sociais ou da relação médico doente. Desta forma, concluímos que esta variável não constituiu, só por si, um indicador aceitável da gravidade do episódio inaugural estudado.

Quanto às variáveis laboratoriais, alguns Ag virais foram pesquisados na mucosa nasal de todas as crianças, no momento da primeira bronquiolite. O teste laboratorial escolhido permitiu apenas a identificação dos seguintes agentes etiológicos: VSR, VPI, VI, Adenovírus. Os negativos possam estar associados a outros agentes como Rinovírus ou Metapneumovírus humano, não detectáveis por este método. Será interessante, noutra ocasião, estudar o comportamento dos doentes com bronquiolite associada a estas estirpes virais, que são responsáveis frequentemente por essa patologia ou por exacerbações de asma brônquica (Williams 2004, Mellendi 2007, Deffrasnes 2007, Silva 2007). Por outro lado, a metodologia que usámos não permitiu distinguir as situações de hiperreactividade brônquica intrínseca da associada com os agentes virais não detectáveis.

O método laboratorial usado para o estudo das citocinas intervenientes na imunidade nasal foi propositadamente adaptado para este estudo. De acordo com a bibliografia consultada, tal estratégia não tinha sido ainda utilizada por outros investigadores em moldes sobreponíveis. Consideramos que a utilização deste tipo de exame permitiu o estudo não invasivo de alguns aspectos da imunidade local no decorrer de uma bronquiolite aguda, nomeadamente através da determinação do comportamento das citocinas associadas ao paradigma Th1 / Th2 e da sua eventual relação com a evolução clínica nos meses subsequentes (Till 2001, Bont 2001, Oh 2002, Boelen 2002, Shahid 2002, Kazachkov 2002, Tripp 2002, Legg 2003, Joshi 2003, Koopman 2003, Stokes-Peebles 2004, Copenhagen 2004, Schauer 2004, Spann 2004, Pitrez 2005, van Benten 2005, Vercelli 2006, Pinto 2006, Duramad 2006, Culley 2006, Becker 2006, Gern 2006, Midulla 2006, Truyen 2006, Puthotu 2006, Stern 2007, Melendi 2007, Chung 2007).

As citocinas são moléculas intervenientes na comunicação entre diversas populações celulares que participam na resposta imune. A “mensagem” que as citocinas transmitem define o tipo de resposta que ocorrerá subsequentemente; com acção exclusivamente local, a nível dos tecidos implicados, actuam em concentrações muito baixas, e têm semividas muito curtas. Será, pois, legítimo especular que, quando se pretende investigar o papel local das citocinas em determinado órgão ou sistema, as determinações devem ser efectuadas em amostras recolhidas a esse nível, e não em células sanguíneas, que poderão eventualmente não reflectir com rigor os fenómenos locais (Copenhagen 2004, Guerra 2004, Stokes-Peebles 2004, Teixeira 2005, van Benten 2005, Friedlander 2005, Oh 2005, Rebordão 2006, Phaybouth 2006, Culley 2006, Truyen 2006, Midulla 2006, Lewis 2006, Melendi 2007, Stern 2007).

Uma vez que, no presente estudo, pretendíamos estudar o comportamento de determinadas citocinas no decorrer de uma bronquiolite aguda, consideramos que o procedimento mais indicado seria o estudo de produtos biológicos provenientes da árvore brônquica distal (lavado broncoalveolar). Têm sido publicados estudos aplicando esta metodologia, principalmente em doentes ventilados ou com indicação clínica para a realização de broncofibroscopia e colheita de lavado broncoalveolar (Krawiek 2001, Mcnamara 2004, Brown 2005, Maclennan 2006). Não sendo este o contexto da população estudada optámos, naturalmente, pelo estudo de produtos biológicos de

origem mais proximal, colhidos nomeadamente à superfície da mucosa nasal. Na realidade, como referido por Tauber (2002), Rosado-Pinto (2003), Romagnani (2004), entre outros, o aparelho respiratório reage de forma uniforme após um estímulo ou uma agressão. Os resultados dos estudos efectuados em produtos oriundos das vias aéreas superiores poderão, desta forma, traduzir os fenómenos que ocorrem a nível dos brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares (Kazachkov 2001, Till 2001, Smyth 2002, Bergoin 2002, Tauber 2002, Bergoin 2002, Mobbs 2002, Joshi 2003, Legg 2003, de Waal 2003, Giugno 2004, Garofalo 2004, Gern 2004, van Benten 2005, Pitrez 2005, Midulla 2006, Pacifico 2006). O respeito aos princípios éticos teve igualmente importância nesta decisão.

A semivida extremamente curta das citocinas, bem como a sua baixa concentração tornam o seu doseamento directo a nível sérico, urinário ou tecidual extremamente difícil e falível. Apesar dos anteriores estudos de autores como Noakes (2003), Friedlander (2005), Guerrero (2005) ou Ly (2007), que investigaram o comportamento das citocinas no sangue do cordão umbilical e outros como Leech (2000), Tripp (2002), Aoyagi (2003), Guerra (2004), Heaton (2005), Rebordão (2006) ou Pinto (2006), que efectuaram estudos semelhantes a nível do sangue periférico, optámos por determinar, a actividade das citocinas de forma indirecta, pesquisando a expressão génica dos ácidos nucleicos que as codificam.

Sabendo que as citocinas que escolhemos são sintetizadas nas células da mucosa nasal, exclusivamente por determinadas populações celulares (linfócitos Th1 e Th2, macrófagos e células *natural killer*), determinámos a sua actividade através da quantificação, por RT-PCR, da expressão dos seus genes.

Numa preparação biológica de conteúdo celular desconhecido, detectámos as expressões génicas (em termos de ARNm) de quatro citocinas implicadas na resposta imune e comparámo-las com a de uma proteína celular de expressão reconhecidamente estável e constante. Este procedimento permitiu que os resultados fossem comparáveis entre os vários doentes, independentemente do número e do tipo de células recolhidas da mucosa nasal. Metodologia semelhante foi usada por outros, tais como McNamara (2004), Feleszko (2006) e Sutton (2007).

A metodologia laboratorial usada, adaptada para esta investigação - RT-PCR – permitiu medir de forma semiquantitativa, essa expressão relativa de cada citocina. A grandeza desta variável correspondeu ao ciclo de reacção de RT-PCR em que a citocina foi identificada na preparação analisada. Quanto mais rápida essa reacção, menor o número de ciclos necessários para a demonstrar. A grandeza da variável apresentada correspondeu ao número de ciclos de replicação necessários para evidenciar a molécula inicial, ou seja, quanto menor o valor numérico, maior a actividade génica inicial de cada citocina. Esta forma de apresentação de resultados é comum em biologia molecular e em imunologia, sendo familiar aos autores que utilizam esta metodologia. Apesar de não ser intuitiva, decidimos mantê-la, na tentativa de garantir o rigor científico do estudo.

Ao contrário de autores como Till (2001), Krawiek (2001), Tripp (2002), Kazachkov (2002), Aoyagi (2003), de Waal (2003), Kim (2003), Brown (2005), Heaton (2005), van Benten (2005), MacLennan (2006), Phaybouth (2006), Pinto (2006), Rebordão (2006) ou Duramad (2006), não isolámos nem identificámos *in vitro* as populações celulares responsáveis pela produção de citocinas. Essa metodologia seria interessante e fiável, contribuindo decerto para um maior rigor deste estudo. Poderia ser possível, designadamente, submeter a diversos estímulos o meio de cultura celular obtido e verificar o respectivo efeito sobre a síntese das diversas citocinas. Não foi possível efectuar esses passos, por dificuldades orçamentais e limitações logísticas no que diz respeito a esses procedimentos laboratoriais. Trata-se de uma via de investigação passível de ser desenvolvida em futuros estudos.

Estudámos diversos comportamentos de resposta imune da mucosa nasal dos lactentes, por ocasião da primeira bronquiolite. Desconhecemos outros estudos em que esta tecnologia tenha sido aplicada a propósito deste tema pelo que, de acordo com a pesquisa bibliográfica exaustiva que levámos a cabo, admitimos que o presente estudo possa corresponder à primeira investigação aplicando esta metodologia, em crianças, de forma não invasiva e com resultados reprodutíveis. Será legítimo, em suma, admitir que a metodologia aplicada possa constituir uma linha futura de investigação.

DOS RESULTADOS

A sibilância transitória do lactente é um tópico vasto e de etiologia multifactorial. Para o seu aparecimento contribuem numerosos factores, de que se salientam: predisposição genética; estágio de desenvolvimento anatómico e funcional do aparelho respiratório; diferenciação estrutural e histológica do mesmo; factores de imunidade geral e local, incluindo atopia e diversos factores ambientais.

O estudo que efectuámos incidiu sobre dois dos fenótipos definidos por Martinez e colaboradores (1995) no estudo de Tucson em lactentes: sibilância precoce transitória e sibilância persistente. Recrutámos uma coorte de lactentes por ocasião de um primeiro episódio de bronquiolite, e acompanhámo-la posteriormente, de forma prospectiva, até ao terceiro aniversário de cada indivíduo.

Registámos quais as crianças que tiveram episódios recorrentes de pieira (enquadrando-se na definição de sibilância transitória do lactente) e quais os que, pelo contrário, não mais voltaram a ter crises de sibilância, tentando determinar os parâmetros associados a esses tipos distintos de evolução clínica.

Por outro lado, foram definidos alguns parâmetros com capacidade de influenciar a imunidade da mucosa nasal, por se associarem, nomeadamente, a diferentes perfis de comportamento das citocinas expressas no momento de uma bronquiolite aguda.

São discutidos primeiramente os aspectos gerais da população estudada, provenientes da análise descritiva e, depois, os dados provenientes da análise univariada e de modelos multivariados.

DA ESTATÍSTICA DESCRITIVA

A amostra populacional estudada incluiu inicialmente 188 crianças, que reuniam os critérios de inclusão definidos, e cujas famílias aceitaram participar no estudo.

No decorrer do seguimento foram excluídas 25 crianças (13,3%). Esta percentagem é justificável pela prevalência, na população infantil, de doenças sibilantes preenchendo os critérios de exclusão, que foram identificadas no decorrer do período de seguimento. Apenas onze doentes abandonaram a consulta, o que corresponde a uma proporção de 5,9%. Este aspecto pode ser considerado positivo, reflectindo, aparentemente a boa relação estabelecida com as famílias no primeiro contacto e no decorrer do ulterior seguimento em consulta. A informação perdida por esta via não terá tido, provavelmente, influência significativa sobre os resultados obtidos.

A fase do trabalho de campo em que se procedeu à inclusão dos doentes no estudo decorreu durante o Outono de 2003 e o início da Primavera de 2004. Tentámos que esta fase coincidisse com o período em que se verifica, na nossa latitude, maior incidência de bronquiolite aguda. Na realidade, verificámos que mais de 80% dos casos ocorreram entre Dezembro e Fevereiro, período a que, no Inverno 2003/2004, corresponderam em Portugal as epidemias de VSR, gripe e, provavelmente, de outros vírus respiratórios (Flores 2004).

De acordo com o planeamento inicial, o recrutamento de novos doentes terminou na 16^a semana do ano de 2004. Constatámos no entanto que, nessa data, se mantinha uma incidência significativamente elevada de bronquiolite aguda entre os doentes que recorriam ao serviço de urgência pediátrica do HSFX. Parece-nos legítimo especular sobre a probabilidade de esses casos serem devidos não à incidência de infecção por VSR mas à persistência de actividade epidémica de outros agentes víricos, como VPI, Adenovírus ou Rinovírus (Hall 2001, Pacifico 2000, Oh 2002, Long 2002, Laham 2004, Flores 2004, Murray 2005, Lindemans 2005, Friedlander 2005, Garofalo 2005, Meats-Dennis 2005, Lemanske 2006, Bennett 2007, Cheung 2007, Desfrases 2007, Melendi 2007, Mansbach 2008). O estudo poderia ter sido prolongado por mais algum tempo, com vantagens em termos de ampliação de colheita de dados, o que não foi possível por ausência de cabimento orçamental.

Neste estudo, a bronquiolite aguda ocorreu predominantemente nos primeiros seis meses de vida. As causas da maior vulnerabilidade dos lactentes desse escalão etário são: a menor resistência imunitária às infecções respiratórias virais, função respiratória de características imaturas e vias aéreas de calibre inferior, tal como referido por autores como Murray (2002), Bisgaard (2003), Legg (2003), Flores (2004), Henderson (2005), Borrego (2005), Braciale (2005), Nielssen (2006), Panickar (2006), You (2006), Voets (2006), Smyth (2006), Al-Shawwa (2006), Bennett (2007) ou Chung (2007).

Encontrámos um predomínio de casos de sibilância aguda em crianças do sexo masculino. Este achado, referido por outros autores, como Boezen (2006) e Lannerö (2006), pode ser atribuído ao tipo de crescimento das vias aéreas nessas idades. Verifica-se, na realidade, que os lactentes do sexo masculino têm brônquios de menor calibre, facto relacionado com factores genéticos e hormonais (Stick 2000, Boezen 2004, Kelley 2005, Landau 2006, Lum 2006). A maturação funcional respiratória ocorre também de forma diversa nos dois sexos (Illi 2001, Borrego 2005, Mallol 2005, Martinez 2005, Uekert 2006, Maclennan 2006, Piippo-Savolainen 2008).

As características heterogéneas da população que recorre ao serviço de urgência onde que o estudo foi efectuado, proporcionaram-lhe alguma variabilidade étnica, com a inclusão de crianças de raça negra e provenientes de etnias asiáticas, cujo pequeno número não permitiu efectuar qualquer análise de grupo. Como seria de esperar, verificou-se predomínio de crianças de raça branca.

Mais de 40% dos progenitores, neste estudo, não tinham completado nove anos de escolaridade. Este aspecto poderá ser indicador das carências sócio-económicas da população estudada (INE 2007).

Os agregados familiares eram, em regra, pequenos, verificando-se que mais de 70% das crianças residiam com três ou menos coabitantes. Esta é uma tendência social comum aos países europeus com baixa taxa de natalidade (INE 2007). A distribuição da idade das mães foi sobreponível à da população em geral. É de destacar uma percentagem de 7,9% de mães adolescentes e 17,1% de mães com idade superior a 35 anos. Estes

valores têm vindo a aumentar nos últimos anos na população em geral e relacionam-se com diversos factores sociais (INE 2007).

O número de irmãos entre a amostra estudada foi comparável com a população em geral, sendo de referir que 80% das famílias tinham menos de três filhos (INE 2007).

Mais de metade dos familiares das crianças estudadas (58,6%) admitiam fumar no domicílio. Esta taxa é superior à referida nas estatísticas oficiais divulgadas para o Continente (INE 2007 e DEPS 2007), que apontam para a incidência de consumo de tabaco em 49,6% dos indivíduos de escalão etário correspondente ao dos pais das crianças estudadas. A metodologia de colheita de dados no presente estudo incluiu um questionário semelhante ao usado pelo INE, o que valida os resultados obtidos.

Mais de metade das crianças (53,3%) com bronquiolite aguda tinham familiares directos com diagnóstico fundamentado de doença atópica. Trata-se de uma percentagem superior à da população portuguesa, sendo de referir que a incidência de doença atópica tem vindo a aumentar nos últimos anos. Avaliadas isoladamente, a percentagem de pais, mães ou irmãos com doença atópica é semelhante à referida por autores como Rosado-Pinto (2003), Nunes (2005) ou Morais-Almeida (2007). Será de admitir, nestas crianças, a existência prévia de uma maior susceptibilidade à ocorrência de sibilância no decorrer de uma infecção vírica (Wright 2004, Eder 2006, Taussig 2008).

As percentagens de crianças com antecedentes de prematuridade (14,6%) e de baixo peso ao nascer (11,6%) foram superiores à da população em geral (de aproximadamente 6,5% em Portugal) (Martins 2002). Estes números poderão traduzir maior vulnerabilidade destas crianças ao envolvimento bronquiolar do decurso de uma infecção viral, dadas as características anatomofuncionais das vias aéreas, atrás descritas.

A percentagem de mães que admitiram fumar durante a gravidez foi, neste estudo, de 27,7%, valor superior ao referido nas estatísticas oficiais referentes aos hábitos tabágicos nos cidadãos do sexo feminino, com idade compreendida entre os 15 e os 44 anos, residentes em Portugal Continental, que se situa nos 18% (INSA 2007). Esta diferença traduz, provavelmente, maior taxa de fumadoras na região de Lisboa e uma

maior susceptibilidade à bronquiolite nas crianças filhas de mães fumadoras, como referido por autores como Kullig (1999), Noakes (2003), Garcuño (2003), Janson (2004), Bradley (2005), Groner (2005), Le Soeuf (2006), Lannerö (2006), Phaybouth (2006), Patenden (2006), Carroll (2007). Seria possível estudar esta variável de forma diferente, através da utilização de outras metodologias. Trata-se de um tópico de interesse, a investigar no futuro.

Cerca de metade das crianças com idade superior a quatro meses frequentava o infantário, valor sobreponível ao da população em geral (INE 2007).

Não encontramos dados estatísticos relativos ao convívio dos lactentes portugueses com animais domésticos. No entanto diversos autores, como Waser (2004), Romagnani (2004), Gern (2005), Bloomfield (2006), Schaub (2006), Vercelli (2006) e Liu (2006), têm relacionado esse convívio com a incidência de patologia atópica, quer pela sensibilização alérgica que condiciona, quer, por outro lado, pela protecção associada ao maior contacto com endotoxinas, como é postulado na hipótese higiénica.

A qualidade do ar no domicílio, no que diz respeito às características em termos de composição, temperatura e humidade relativa, pode estar relacionada com o tipo de aquecimento doméstico. A utilização habitual de algum sistema de aquecimento (aquecedor a gás ou lareira) foi referida em cerca de um quarto dos casos estudados. O pequeno número de crianças em cada um destes subgrupos não permitiu estudar esta variável de forma mais aprofundada.

O quadro clínico de eczema atópico foi referido em 15,8% dos lactentes, percentagem inferior à relatada na região de Lisboa (Rosado-Pinto 2003, Morais-Almeida 2007). No entanto, os dados do presente estudo referem-se apenas ao diagnóstico de eczema nos dois primeiros anos de vida, ao passo que no estudo ISAAC se referem taxas de incidência cumulativa ao longo de um período mais alargado.

A febre surgiu no decorrer do primeiro episódio de bronquiolite aguda em 38,2% dos casos. Apesar de esta patologia ser, na maioria das vezes, de etiologia infecciosa, nomeadamente vírica, sabe-se que no que diz respeito à resposta ao VSR, o agente mais frequente de bronquiolite aguda, esta frequentemente não cursa com febre. A

etiopatogenia de tal fenómeno é ainda mal compreendida, podendo a apirexia ser parcialmente explicada pela resposta imune à infecção por VSR. Esta ocorre preferencialmente a nível das células epiteliais respiratórias, com escassa libertação de moléculas pirogénicas, como referido por Hacking (2002), Boelen (2002), Aoyagi (2003), Ogra (2004), Tripp (2005), Lindemans 2005, Stokes-Peebles (2005), Braciale (2005), Becker (2006), Pinto (2006), Melendi (2007), Bennett (2007) ou Chung (2007). Por outro lado, nalguns casos, o primeiro episódio de sibilância pode não se relacionar com etiologia infecciosa, não evoluindo, dessa forma, com a ocorrência de febre. A conjugação destes factores explica, provavelmente, a elevada percentagem de doentes sem febre no episódio de inclusão no estudo.

O estudo da variável “gravidade da bronquiolite”, baseado na atribuição de um índice semiquantitativo simples e reproduzível, evidenciou que algumas crianças tiveram formas extremamente graves ou muito ligeiras da doença, classificando a maioria dos casos em graus de gravidade intermédia. Tal circunstância permitiu-nos um estudo estatístico baseado na distribuição gaussiana.

Quanto à radiografia do tórax predominaram os aspectos mais usuais nesta patologia, resultantes da hiperinsuflação distal da árvore brônquica (Silverman 2001, Long 2002, Leiria 2003, Smyth 2006, Taussig 2008). Alguns padrões radiográficos foram descritos como de tipo intersticial ou condensação / atelectasia. Não foi encontrada relação entre estes diversos padrões e a respectiva gravidade clínica.

A pesquisa de vírus nas secreções nasais permitiu identificar o agente etiológico em dois terços dos casos. Em mais de metade destes foi identificado VSR, como referido na maioria dos estudos consultados. Encontrámos outros agentes virais na proporção esperada (Long 2002, Flores 2004, Meats-Dennis 2005, Garofalo 2005, Chaves-Bueno 2006, Singh 2007, Mansbach 2008). Quanto às crianças com bronquiolite aguda em que não foi possível identificar agente etiológico, admitimos que, nalguns casos, a situação se possa dever a outros agentes não pesquisados (Metapneumovirus humano, Rinovírus, *Mycoplasma* ou outro). Noutros casos, numa frequência que não nos foi possível objectivar, a hiperreactividade brônquica poderá ter estado associada a outros factores.

Nos doentes internados foram efectuados estudos dos diversos tipos de leucócitos do sangue periférico, não tendo sido evidenciadas alterações significativas na maioria dos casos de bronquiolite. Desconhecemos se o estudo desta variável em todos os doentes (não apenas os internados mas também os tratados em ambulatório) poderia conduzir a conclusões diversas.

O paradigma Th1/Th2 tem sido estudado na asma brônquica e nas doenças atópicas. Diversos estudos têm permitido acumular argumentos a favor da chamada *hipótese higiénica*, que atribui o aumento de frequência de doenças alérgicas no mundo ocidental à alteração do equilíbrio entre as diversas citocinas favorecendo, nomeadamente, o predomínio Th2 (Openshaw 2000, Busse 2001, Shahid 2002, Bracken 2002, Fireman 2003, Kim 2003, Stokes-Peebles 2004, Wills-Karp 2004, Heaton 2005, Hayashi 2005, Waser 2005, Friedlander 2005, Eder 2006, Zeldin 2006, Bloomfield 2006, Lemanske 2006, Truyen 2006, Ramsey 2007, Lee 2007). Por outro lado, nos países em que se tem verificado um aumento na prevalência de tal patologia, tem sido igualmente referido um incremento paralelo de novos casos de doenças autoimunes (artrite reumatóide, *diabetes mellitus* tipo 1, esclerose múltipla, entre outras), situações associadas habitualmente a um desequilíbrio no sentido contrário (predomínio Th1) (Christen 2005, Schaub 2006, Vercelli 2006). Estes estudos sugerem interacções complexas, pelo que actualmente os modelos defendidos para explicar as relações entre as vias imunitárias de sentidos opostos (Th1 *versus* Th2) se tornaram menos simplistas que os defendidos pela hipótese higiénica inicial, incluindo actualmente sofisticadas vias de regulação e contrarregulação (Romagnagi 2004, Brown 2005, Bloomfield 2006, Liu 2006).

O material biológico colhido era relativamente frágil e sujeito a deterioração durante a colheita, transporte, ou num dos múltiplos passos do delicado procedimento laboratorial. Apesar destes condicionalismos, foi possível determinar a expressão génica das citocinas em 53,9% a 78,9% dos casos estudados, percentagens que consideramos significativas. As diversas variáveis tiveram distribuição gaussiana.

No decorrer do seguimento em consulta, 50% do total das crianças foram classificadas como sibilantes e as restantes como não sibilantes, o que está de acordo com o referido por Leiria (2003), Silverman (2001), Long (2002), Taussig (2008) entre outros, quanto à incidência da sibilância recorrente na primeira infância.

Às 76 crianças sibilantes foi aplicado, no final do seguimento, o IPA, de acordo com a proposta de Castro-Rodriguez e colaboradores (2006). O resultado (positivo em 48,7% e negativo nos restantes) foi sobreponível ao esperado, dada a prevalência de asma no nosso país (Videira 2006, Morais-Almeida 2007). Seria, pois, interessante reavaliar estas crianças em estudos ulteriores, do ponto de vista da evolução para asma brônquica e sensibilização atópica ao longo dos anos.

A amostra de doentes seleccionada pareceu-nos, desta forma, representativa da população-alvo do estudo, com características demográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais de acordo com o inicialmente previsto.

DOS MODELOS UNIVARIADOS

Dos factores associados à evolução para sibilância recorrente

Em relação ao estudo global da amostra, verificou-se maior probabilidade de evolução para sibilância recorrente nos doentes que, no momento da bronquiolite inicial, apresentaram as seguintes características:

- Idade inferior
- Exposição a fumo de tabaco (antenatal ou pós-natal)
- Mãe com doença atópica
- Apirexia no primeiro episódio de bronquiolite
- Apresentação clínica inicial com maior gravidade ou com necessidade de internamento hospitalar
- Isolamento de vírus respiratórios nas secreções nasais (predominantemente VSR)
- Predomínio da resposta imunitária de tipo Th2 (traduzido por maior expressão de IL-4) no subgrupo de lactentes com idade superior a seis meses.

Idade

Nas crianças que evoluíram para sibilância recorrente verificou-se que o primeiro episódio de bronquiolite ocorreu cerca de 3 meses antes das restantes, o que está de acordo com as observações de outros investigadores, como Gern (2004), Brouard (2004), Henderson (2005), Nafstad (2005), Oh (2006), Ly (2006), You (2006), Graham (2006), Lazzaro (2006), Lemanske (2006), Voets (2006), Ramsey (2007) ou Chung (2007). Com efeito, as crianças mais pequenas têm capacidade imunitária mais limitada na resolução de processo inflamatório brônquico persistente. Concomitantemente, a árvore brônquica tem, nesse escalão etário, menor calibre e maior elasticidade, aspectos que poderão predispor para sibilância nos anos seguintes (Bracken 2002, Martinez 2002, Boezen 2004, Mallol 2005, Landau 2006, Loland 2006, Lum 2006, Lemanske

2006, Maclennan 2006, Graham 2006, Prescott 2006, Reed 2006, Uekert 2006, Stensballe 2006, Chung 2007, Cortés Alvarez 2007 e Piippo-Savolainen 2008).

Fumo de tabaco

O fumo de tabaco contribuiu para aumentar de forma significativa a probabilidade de manutenção de sibilância recorrente após uma bronquiolite aguda. Este efeito foi verificado nos doentes estudados, nos casos em que o tabaco fora consumido na vida intrauterina - com um incremento de 2,5 vezes (IC95%: 1,2-5,2) - tal como referido por Sherriff (2001), Prescott (2006), Pattenden (2006), Le Soeuf (2006) ou Horak (2007); quer após o nascimento - com um aumento de 2,0 vezes (IC95%: 1,1-3,9) - tal como descrito por outros autores como Barrett (2002), Garcuño (2003), Janson (2004), Bradley (2005), Morais-Almeida (2006), Landau (2006), Diaz-Sanchez (2006) ou Felezsko (2006).

Tal associação pode explicar-se pelo facto de o contacto com fumo de tabaco durante a vida intrauterina perturbar directamente o desenvolvimento das vias aéreas e do parênquima pulmonar (Lannerö 2006, Pattenden 2006, Carroll 2007, Prescott 2008), havendo autores que demonstraram, igualmente, alteração das funções imunitárias locais (Noakes 2003, Felezsko 2006, Le Souef 2006, Prescott 2008).

Por outro lado, após o nascimento, o contacto com fumo de tabaco afecta predominantemente a função mucociliar e a imunidade local (Rumold 2001, Mitchell 2002, Janson 2004, Groner 2005, Bradley 2005, Diaz-Sanchez 2006, Pattenden 2006, Phaybouth 2006, Horak 2007, Prescott 2008, Sadeghnejad 2008).

Como foi notado por Bacharier (2008), os programas governamentais que têm como objectivo diminuir o consumo de tabaco em locais públicos poderão contribuir para aumentar o consumo de tabaco no domicílio, colocando, paradoxalmente, as crianças e grávidas em maior risco de exposição tabágica.

No presente estudo verificou-se risco acrescido de sibilância recorrente ao longo dos três primeiros anos de vida, quer nas crianças expostas ao fumo de tabaco no decorrer da vida intrauterina quer nas expostas apenas após o nascimento. A este propósito, cabe

salientar que seria interessante quantificar tal factor de risco, nomeadamente quanto ao número e tipo de cigarros fumados e à acumulação de constituintes do fumo de cigarro no organismo das crianças, cuja determinação qualitativa e quantitativa é actualmente exequível.

Atopia materna

Nos filhos de mães atópicas, verificou-se maior número de casos de sibilância recorrente após a primeira bronquiolite - OR 2,1 (IC95%: 1,0-4,3). Não encontramos diferenças no que concerne à presença de atopia no progenitor masculino ou nos irmãos.

Este achado poderá traduzir, nalguns casos, uma primeira evidência do risco de asma brônquica. Por definição, no entanto, em nenhum dos lactentes por nós estudados se demonstrou laboratorialmente, no decorrer do seguimento, qualquer sensibilização atópica.

A associação entre sibilância precoce e atopia materna pode efectivamente indiciar a participação de factores genéticos, que condicionariam alguma diversidade entre os diversos mediadores implicados. Os diferentes fenótipos de síndrome sibilante da infância podem ser explicados parcialmente por esses factores (Bracken 2002; Hoffjan 2005; Bradley 2005; Graham, Videira 2006; Carroll, Ermers, 2007); contudo, este é um aspecto que necessita de investigação mais alargada, a fim de compreender os mecanismos envolvidos. O estudo destes doentes durante um período de tempo mais prolongado poderia, nomeadamente, esclarecer se estas crianças se irão ou não tornar asmáticos.

Febre

A febre no episódio inaugural de sibilância constituiu, no presente estudo, um factor protector de sibilância futura. Um primeiro episódio de bronquiolite em apirexia aumentou em 4,6 vezes (IC95%: 1,6-6,3) o risco de sibilância recorrente.

O facto de a infecção por VSR evoluir frequentemente sem febre pode contribuir para explicar este facto (Long 2002, Hacking 2002, Smyth 2002, Legg 2003, Black 2003,

McNamara 2004, Ogra 2004, Flores 2004, Psarras 2004, Lindemans 2005, Murray 2005, Garofalo 2005, Tripp 2005, Al-Shawwa 2006, Pickering 2006, Chavez-Bueno 2006, Oh 2006, Bennett 2007, Melendi 2007). A explicação para a ausência de febre no decorrer de uma infecção por VSR é complexa, podendo relacionar-se com a circunstância de a referida infecção afectar exclusivamente as células epiteliais respiratórias, com formação de sincícios. Este fenómeno inibe ou atrasa o reconhecimento da infecção pelo sistema imune do hospedeiro e, como tal, a produção de interferão e outros mediadores pirogénios (Piedimonte 2002, Hacking 2002, Black 2003, Spann 2004, Ogra 2004, Lindemans 2005, Openshaw 2005, Stokes-Peebles 2005, Tripp 2005, Culley 2006, Bennett 2007).

Por outro lado, é possível que, nalguns casos, o episódio inicial não tenha tido etiologia infecciosa, decorrendo, como tal, sem febre associada. É, pois, lícito especular que uma bronquiolite que evolui sem febre possa constituir uma manifestação precoce de uma doença inflamatória das vias aéreas de pequeno calibre, nomeadamente asma brônquica, mesmo em doentes não sensibilizados do ponto de vista atópico. O seguimento destas crianças por um período de tempo mais alargado, com a eventual repetição de estudos alergológicos em idades mais tardias, poderá esclarecer a probabilidade de evolução nesse sentido.

Gravidade do primeiro episódio

A gravidade do primeiro episódio de bronquiolite, avaliada de acordo com um índice validado, mostrou associar-se de forma muito significativa, no modelo univariado, à manutenção de sibilância recorrente nos primeiros três anos de vida. Efectivamente, cada ponto de incremento no índice de gravidade utilizado aumentou em 1,2 vezes (IC95%: 1,1-1,3) o risco de crises de sibilância nos meses subsequentes.

A conjugação de uma avaliação clínica cuidadosa (frequência respiratória, presença e grau de tiragem, alterações da auscultação pulmonar, estado geral e cor da pele) com a avaliação da saturação transcutânea de oxigénio (disponível em qualquer serviço de urgência) contribuiu para prever a evolução da sibilância das crianças nos primeiros anos de vida. A importância da gravidade de um primeiro episódio de bronquiolite como factor preditivo de sibilância recorrente subsequente tem sido valorizada por

autores como Simões (2003), Smyth (2002), Stokes-Peebles (2005), Bradley (2005), Al-Shawwa (2006), Voets (2006) e outros, em cujos estudos se verificou associação da maior gravidade inicial a alterações inflamatórias mais marcadas e persistentes a nível da árvore brônquica. A recuperação anatômica, funcional e inflamatória seria, neste contexto, mais demorada, contribuindo para a persistência da sintomatologia durante vários meses.

Vírus

As crianças com evolução para sibilância recorrente ou persistente foram aquelas em que foram isolados com maior frequência, no episódio inicial, vírus respiratórios. Esse isolamento associou-se a um aumento de 3,4 vezes (IC95%: 1,6-7,1) da probabilidade de evolução para sibilância recorrente. Entre estes agentes, destacou-se o VSR com *odds ratio* de 4,2 (IC95%: 2,1-8,5). Sabe-se que este é o agente viral que, depois do Adenovírus, provoca alterações imunológicas e histológicas mais marcadas a nível da mucosa brônquica, de recuperação lenta e repercussões clínicas a longo prazo mais importantes (Hacking 2002, Copenhaver 2004, Braciale 2005, Chavez-Bueno 2006, Al-Shawwa 2006, Bennett 2007).

A baixa incidência de Adenovírus, VI e VPI nos doentes estudados tornou impossível retirar eventuais ilações estatísticas em relação a esses agentes. Nesta perspectiva, a pesquisa de diferenças entre os diversos agentes virais no que concerne à evolução para sibilância recorrente legitima a realização de estudos futuros, quer na área da investigação clínica, quer na da investigação básica.

É possível que, nalguns doentes com resultado negativo quanto à pesquisa de vírus respiratórios, tivessem ocorrido infecções por outros agentes não pesquisados (Metapneumovírus humano ou Rinovírus). Não é fácil identificar estes agentes na prática clínica actual, dado exigirem PCR ou isolamento em cultura celular. No entanto são, habitualmente mais benignos quer na fase aguda quer como iniciadores de sibilância recorrente, conforme referido por autores como Hall (2001), van Woensel (2003), Williams (2004), Laham (2004), Garofalo (2005), Weinberg (2006), Oh (2006), Cheung (2007), Lazzaro (2007), Lee (2007), Desfranes (2007), Melendi (2007) ou Ramsey (2007).

Em suma, na presente investigação, o isolamento de vírus respiratórios no decorrer da primeira bronquiolite esteve associado a um aumento significativo do risco de sibilância recorrente nos meses subsequentes. Este achado é corroborado por outros autores, como Illi (2001), Fonseca (2003), Korppi (2004), Garofalo (2004), Laham (2004), Friedlander (2005), You (2006), Gern (2006) ou Graham (2006).

Citocinas da mucosa respiratória

A expressão das citocinas variou de forma estatisticamente não significativa entre os dois grupos, legitimando a conclusão de que a ocorrência de sibilância recorrente não depende de alterações imunológicas precoces que acompanham o primeiro episódio de bronquiolite. Existirão outros factores com maior importância como, nomeadamente, a predisposição genética, as alterações prévias da função respiratória, o calibre estreito das vias aéreas e as características do muco ou da mobilidade ciliar, conforme foi referido por autores como Martinez (1995), Sigurs (2000), Silverman (2001), Wright (2004), Stokes-Peebles (2005), Zeldin (2006) ou Singh (2007).

No grupo de crianças com idade superior a seis meses detectou-se, em análise univariada por escalão etário, uma tendência discreta mas significativa para maior expressão de IL-4. Este aspecto traduz predomínio das citocinas Th2 nestas idades. Admitimos, desta forma, que, após os seis meses, as restantes causas atrás referidas se mantêm com significado, começando entretanto a emergir determinados mecanismos imunológicos locais que desviam a imunidade no sentido Th2.

A maior expressão de IL-4 que encontramos nos doentes estudados foi anteriormente referida por outros autores, em modelos animais (Boelen 2002, Stokes-Peebles 2005, Phaybouth 2006, You 2006) ou em pacientes humanos. Estes últimos basearam-se em determinações efectuadas no sangue periférico (Guerra 2004, Rebordão 2005, Heaton 2005, Guerrero 2005, Friedlander 2005, Pinto 2006, Ly 2007) ou no lavado broncoalveolar (Krawiek 2001, Mobbs 2002, Kim 2003, McNamara 2004, Brown 2006, MacLennan 2006). Esta metodologia, apesar de fornecer informação mais fiável, é difícil de aplicar na população pediátrica com as características da que foi estudada, designadamente por imperativos éticos. No presente estudo, a metodologia foi menos

invasiva, sendo que os resultados obtidos reflectiram provavelmente alguns processos imunológicos comuns a todo o aparelho respiratório, considerando a sua globalidade estrutural e metabólica (Bont 2001, Till 2001, Kazachkov 2002, Smyth 2002, Gern 2002, de Waal 2003, Legg 2003, Joshi 2003, van Benten 2004, Garofalo 2004, Pitrez 2005, Midulla 2006). Estes aspectos merecem ser aprofundado em investigações futuras.

Como o presente estudo foi iniciado no decorrer do primeiro episódio de sibilância de cada criança, poderá admitir-se a possibilidade de esta orientação da imunidade local no sentido Th2 existir previamente, estando condicionada por factores genéticos ou ambientais, estando, até aí, latente (Copenhagen 2004, Hoffjan 2005, Brussee 2005, Inácio 2006, Gern 2006, Becker 2006, Eder 2006, Bloomfield 2006, Ermers 2007, Singh 2007).

Ao contrário do referido noutros estudos, nenhum dos seguintes parâmetros avaliados se relacionou com a evolução para sibilância recorrente: semana epidémica da infecção inicial, sexo, raça, classe social, número de coabitantes, idade da mãe, número de irmãos, atopia no pai ou irmãos, idade gestacional, peso ao nascer, aleitamento materno, frequência de infantário, contacto com animais, tipo de aquecimento doméstico, antecedentes pessoais de eczema atópico, aspecto da radiografia do tórax ou leucograma.

O sexo masculino é muitas vezes associado a lume mais estreito das vias aéreas (Stick 2000, Cifuentes 2003, Uekert 2006) e, consequentemente, risco mais elevado de perpetuação de obstrução bronquiolar com significado clínico, após uma agressão vírica da mucosa. Na série estudada verificámos, no momento da primeira bronquiolite, existir predomínio do sexo masculino na razão de 1,5:1 o que confirma a maior tendência, nos rapazes, para que uma infecção por vírus respiratórios curse com sibilância (Cifuentes 2003, Silvestri 2004). No entanto, a repetição dos episódios de sibilância nos meses subsequentes foi sobreponível em ambos os sexos. Este facto aponta para uma atenuação, ao longo do tempo, das diferenças estruturais e funcionais entre os sexos, o que contraria as observações de Sherrieff (2001), Landau (2006), Campo (2006) ou Uekert (2006).

Não encontramos, igualmente, diferença na evolução para sibilância entre os grupos étnicos. Trata-se de uma variável que pode associar, por sua vez, factores genéticos, culturais e sócio-económicos. Gold (1999), Klinnert (2001) e Bradley (2005), entre outros, detectaram um maior risco de sibilância após bronquiolite em crianças de raça negra, o que não se verificou no presente estudo.

As crianças provenientes de baixos estratos sócio-económicos têm, de modo geral, maior risco de doenças infecciosas e, eventualmente, menor acesso a cuidados de saúde. Assim, tal como observado por Gold (1999), Sherriff (2001), Mallol (2005) ou Duramad (2006), os mesmos poderão ter risco aumentado de recorrência de sintomas respiratórios. No presente estudo não verificámos diferenças entre os dois grupos, no que concerne a esta variável.

Da mesma forma, o número de coabitantes, o número de irmãos e a frequência de infantário poderão contribuir para um maior número de crises de sibilância, na medida em que existe maior probabilidade de contacto com infecções respiratórias, situações que, num indivíduo susceptível, cursam frequentemente com envolvimento das vias aéreas de menor calibre. Pelo contrário, como defendido pela hipótese higiénica, este mesmo contacto com agentes infecciosos pode desviar a imunidade no sentido Th1 com consequente diminuição dos fenómenos de reactividade brônquica (Ball 2000, Klinnert 2000, Sherriff 2001, Cifuentes 2003, Taussig 2003, Martinez 2005, Lemanske 2006, Campo 2006).

Nenhuma destas variáveis mostrou, individualmente, ter significado no presente estudo quer aumentando quer diminuindo a incidência de sibilância recorrente após bronquiolite aguda. Admitimos, desta forma, que estes mecanismos se possam equilibrar e anular mutuamente, não dispondo de dados para, numa criança com sibilância transitória do lactente, aconselhar a diminuição de convívio com outras crianças ou, nomeadamente, a evicção do infantário.

Brooks (2001) refere o baixo peso ao nascer e a prematuridade como importantes factores de risco para sibilância recorrente. As crianças com tais antecedentes teriam, em comparação com os restantes do mesmo escalão etário, diferenciação imunitária

menos estabelecida e calibre brônquico inferior, o que lhes proporcionaria maior probabilidade de sintomatologia sibilante nos primeiros anos de vida. Essa relação não foi encontrada neste estudo, de cujo material, como se recorda, foram excluídos os lactentes com idade gestacional inferior a 32 semanas ou peso de nascimento inferior a 1500 g, populações nas quais esses factores terão maior importância.

O aleitamento materno, pela sua capacidade imunomoduladora, é considerado um factor de protecção de infecções respiratórias e de fenómenos de hiperreactividade brônquica (Oddy 2002, Wills-Karp 2004, Kull 2005, Obihara 2005, Friedman 2005, Chantry 2006, Paricio-Talayero 2006, Ermers 2006, Fredriksson 2007). Neste estudo a percentagem de crianças amamentadas foi semelhante nos dois grupos (65,8% nos sibilantes e 59,2% nos não sibilantes), pelo que não podemos considerar que seja um factor com influência significativa sobre o aparecimento de sibilância recorrente.

Segundo a hipótese higiénica, o convívio com animais domésticos diminuiria a hiperreactividade brônquica, por se associar a estímulo da via Th1. Pelo contrário, em indivíduos sensibilizados às faneras de animais, esse convívio poderia condicionar maior incidência de manifestações clínicas (Gern 2004, Romagnani 2004, Waser 2005, Bloomfield 2006, Vercelli 2006, Liu 2006, Shaub 2006). No presente estudo não detectámos diferenças entre os dois grupos, pelo que não obtivemos argumentos para aconselhar ou desaconselhar o convívio com animais domésticos.

O eczema atópico tem sido referido como um importante factor de risco de sibilância recorrente (Kull 2005, Matsumoto 2005, Asher 2006, Morais-Almeida 2007). Esta é uma manifestação precoce de atopia sendo que, muitas vezes, a “marcha alérgica” se inicia por essa entidade nosológica. Admitimos que se trata de um factor de risco importante de sibilância de início tardio, conforme definido pelo grupo de Martinez (1995), e não tanto da sibilância recorrente transitória do lactente, que investigámos. No presente estudo não foram encontradas diferenças entre os dois grupos (sibilantes ou não sibilantes), no que diz respeito à prevalência de eczema atópico.

A bronquiolite aguda pode cursar com diferentes padrões radiográficos do tórax e alterações do leucograma (Long 2002, Meats-Dennis 2003, Red Book 2006, Smyth 2006, Voets 2006, Chavez-Bueno 2006, Carroll 2007, Bennett 2007, Taussig 2008).

Neste estudo não foi possível evidenciar quaisquer diferenças destas variáveis, consoante a evolução subsequente dos doentes.

Em conclusão, os resultados apresentados evidenciam que a sibilância transitória do lactente constitui uma patologia multifactorial complexa, na qual interagem, além da imunidade, fenómenos físicos e de desenvolvimento, bem como influências genéticas e ambientais. O paradigma Th1/Th2 poderá ter um papel subtil na fisiopatologia da sibilância transitória do lactente, nos casos em que a sintomatologia surge após os seis meses de idade.

Dos factores que influenciaram a expressão das citocinas nasais

Consideramos que uma das particularidades deste estudo foi a sua contribuição para o conhecimento do perfil das citocinas na mucosa nasal no decorrer de uma bronquiolite aguda, aspecto ainda não estudado de forma exaustiva por outros investigadores. Procurámos relacionar a expressão desses mediadores com a evolução ulterior das crianças, no que diz respeito à ocorrência de outros episódios de sibilância nos primeiros anos de vida.

As alterações que verificámos foram, em geral, subtis, não tendo sido possível identificar, como tínhamos inicialmente postulado, subgrupos com características bem definidas nos quais fosse possível demonstrar inversão inequívoca do equilíbrio Th1/Th2. No entanto, detectámos diferenças com significado estatístico, que são discutidas de seguida e que sugerem algumas tendências bem definidas, a estudar mais aprofundadamente no futuro.

As diferentes expressões das citocinas a nível das vias aéreas superiores estão, com maior probabilidade, relacionadas com condicionantes prévios de cada doente, de natureza intrínseca (genética, imunidade, entre outros) ou extrínseca (tabaco, tipo de vírus, etc.). O estímulo agudo inerente ao episódio inicial de bronquiolite poderá igualmente ter influenciado o perfil de citocinas nasais.

Procurámos, dessa forma, obter uma visão abrangente destes fenómenos estudando, por técnicas de biologia molecular, a actividade de duas citocinas intervenientes nas vias Th2 (IL-4 e IL-13) e de outras duas que participam nas vias Th1 (IL12 e IFN- γ).

IL-4

A IL-4 é uma citocina cuja actividade aumenta em fenómenos imunológicos de tipo Th2 (atopia ou hipersensibilidade), estimulando directamente a produção de IgE.

Encontrámos, no presente estudo, uma única diferença com significado estatístico na expressão génica desta citocina: menor expressão de IL-4 nas crianças em que foram identificadas estirpes virais no episódio de bronquiolite inicial.

É possível que esta inibição de IL-4 traduza, neste contexto, estimulação relativa das vias de tipo Th1, induzida pelo contacto com os vírus. Autores como Mobbs (2002), Legg (2003), Psarras (2004), Becker (2006), Culley (2006) e Prescott (2006), estudando este parâmetro, encontraram resultados semelhantes, principalmente na infecção por VSR. Por outro lado, Jones (2001) e Aoyagi (2003), em modelos animais, ou Stokes-Peebles (2005) e Melendi (2007), em doentes infectados por VSR, descreveram alterações inversas, traduzidas por aumento de produção de IL-4 e diminuição concomitante de IFN- γ , aspectos que correspondem indução das vias Th2. Tripp (2002), de Waal (2003) e Neaville (2003) verificaram por seu lado, nos seus estudos, estimulação simultânea de IL-4 e IFN- γ induzida por VSR.

A diversidade e aparente discordância nos resultados atestam a complexidade das respostas imunitárias ao VSR. Gern (2004) e Braciale (2005) explicam estas diferenças pela resposta predominante do hospedeiro definida pela sua predisposição genética: nos casos em que a resposta se dirige contra a proteína vírica F, o predomínio é de tipo Th1; quando a resposta é dirigida contra a proteína vírica G, o predomínio encontrado é, pelo contrário, de tipo Th2.

Não podemos, no entanto, excluir a possibilidade de esta alteração (défice relativo de IL-4), existindo previamente, favorecer a infecção por vírus respiratórios (Hoebee 2003).

IL-13

A IL-13 tem comportamento semelhante a IL-4, tendo igualmente maior expressão nas situações de predomínio Th2.

Nos doentes estudados detectámos menor expressão de IL-13 nas crianças alimentadas com leite materno, aspecto sugestivo de predomínio Th1. Pelo contrário, encontrámos valores superiores de IL-13 (predomínio Th2) em crianças com linfocitose e eosinofilia no decorrer do primeiro episódio de bronquiolite aguda.

A este propósito, em relação ao factor “aleitamento materno”, parece-nos legítimo especular que a diminuição de IL-13 em lactentes amamentados tenha precedido a bronquiolite aguda inaugural, o que corresponde a um aspecto integrante da imunomodulação promovida pelo aleitamento materno, conforme referido anteriormente por autores como Friedman (2005), Obihara (2005), Duramad (2006) ou Bryan (2007). Sabendo-se que o leite materno contribui para melhorar a imunidade em relação às infecções respiratórias, admitimos que, nessas crianças, possa existir previamente algum predomínio relativo das vias Th1.

O valor quantitativo de linfócitos e eosinófilos no sangue periférico dos doentes internados correlacionou-se positivamente com a expressão de IL-13 na mucosa nasal, traduzindo, assim, um predomínio Th2. Esta correlação está de acordo com as funções atribuídas a estas células a nível da hiperreactividade brônquica (Reya 2001, Krawiek 2001, Barrett 2002, Elias 2003, Kim 2003, Morais-Almeida 2004, Matsumoto 2005, Truyen 2006).

Admitimos, desta forma, que as alterações detectadas no sangue periférico não traduzem de forma fiável as reacções imunitárias que ocorrem nas mucosas, quer no que se refere aos glóbulos brancos e suas populações quer, muito provavelmente, a outros marcadores biológicos avaliados em laboratório.

IL-12

A IL-12 é uma citocina que integra as vias Th1, participando activamente no combate às infecções virais.

Nesta investigação, a expressão génica de IL-12 foi mais elevada nas crianças que frequentavam o infantário, bem como naquelas que tiveram linfocitose. Nestas situações verificou-se predomínio das vias Th1. Por outro lado, nas crianças sujeitas ao fumo de tabaco no domicílio e naquelas cujas mães referiam escolaridade mais elevada verificou-se menor expressão desta citocina, com consequente predomínio Th2.

A frequência prévia de infantário aumentou a probabilidade de ocorrência de contacto com agentes virais, estimulando, desta forma, a via Th1. Este aspecto foi anteriormente mencionado por, entre outros, Ball (2000), Stokes-Peebles (2004), Brouard (2004), Friedlander (2005), de Meer (2005), Braciale (2005), Nafstad (2005), Martinez (2005), Bloomfield (2006), Gern (2006), Eder (2006), Schaub (2006), Lemanske (2006), Landau (2006), Morais-Almeida (2007), Cortés-Alvarez (2007) e Lee (2007).

A linfocitose correlacionou-se directamente com uma maior expressão de IL-12. Ao contrário do detectado na determinação do parâmetro anterior (IL-13), a relação parece aqui ser inversa, com estímulo no sentido Th1. Na consulta bibliográfica efectuada não conseguimos explicar inteiramente este fenómeno, que parece traduzir um comportamento errático dos linfócitos circulantes. Estes achados merecem, pois, ser mais adequadamente esclarecidos em futuras investigações.

No presente estudo, encontramos menor expressão de IL-12 (predomínio Th2) nas crianças expostas habitualmente ao fumo de tabaco, o que poderá traduzir um efeito directo desse factor na modificação, ao longo do tempo, da imunidade local das vias aéreas. Barrett (2002), Silvestri (2004), Phaybouth (2006) e Prescott (2006), entre outros, têm estudado este assunto, com conclusões semelhantes. O fumo de tabaco poderá, nestes doentes, ter originado alterações a nível da imunidade local das fossas nasais no sentido da inibição da via Th1, necessária ao combate às infecções virais. Tal efeito favorece, de forma indirecta, a via Th2, a que se associa a fenómenos de hiperreactividade brônquica.

Haverá relação entre tais modificações e a maior probabilidade de sibilância que detectámos nas crianças expostas ao fumo de tabaco? É difícil estabelecer, neste estudo, uma relação absoluta de causa-efeito, mas admitimos que possa, na realidade, constituir uma via importante nesse sentido. Outros estudos poderão contribuir para o esclarecimento das questões que levantamos.

A maior escolaridade materna teve efeito semelhante, contribuindo para um predomínio Th2. Tal variável constitui um bom indicador de classe social elevada, associada a maiores recursos económicos, maior acesso a conhecimentos, condições de vida mais higiénicas, menor número de coabitantes e acesso mais fácil a cuidados médicos. As crianças integradas em tal meio vivem num ambiente mais “limpo”, próprio de uma sociedade ocidental desenvolvida, com menos contacto com infecções e endotoxinas, o que condicionaria o predomínio progressivo de uma imunidade de tipo Th2. Se assim for, as alterações que detectámos poderiam estar estabelecidas nestas crianças mesmo antes da ocorrência da primeira bronquiolite aguda (Romagnani 2004, Bloomfield 2006, Liu 2006, Schaub 2006, Vercelli 2006).

IFN- γ

O IFN- γ é a citocina mais representativa da via Th1, sendo produzida pelos linfócitos Th1 e células *natural killer*.

Tal como no caso da citocina de função análoga avaliada neste estudo (IL-12), a expressão de IFN- γ foi mais elevada, correspondendo a um predomínio das vias imunitárias Th1, em crianças que contactavam com maior frequência com outras crianças, principalmente no decorrer da frequência de infantário. Pelo contrário, a sua expressão foi mais baixa, traduzindo predomínio Th2, em lactentes sujeitos ao fumo de tabaco no domicílio bem como nos que tiveram formas mais graves de bronquiolite aguda, muitas vezes com necessidade de internamento hospitalar.

As duas primeiras associações (infantário e contacto com fumo de tabaco) foram discutidas anteriormente (IL-12). Conclusões semelhantes são apresentadas nos estudos de Rumold (2001), Friedlander (2005), Phaybouth (2006), Le Soeuf (2006) ou Prescott (2006), para além de outros.

A maior gravidade da bronquiolite aguda inicial, com necessidade de maior número de internamentos hospitalares, terá ocorrido em lactentes que, por condicionantes constitucionais ou ambientais teriam, previamente, actividade inferior de IFN- γ . Será pois legítimo concluir que, no momento da bronquiolite aguda inaugural, aqueles tinham menor capacidade de resposta imediata e eficaz contra as agressões virais, o que condicionaria expressão mais exuberante do quadro clínico (Truyen 2006, Al-Shawwa 2006).

Salienta-se, por fim, que não encontrámos diferenças significativas quanto ao comportamento das várias citocinas quando relacionadas com os restantes parâmetros avaliados. No entanto, parece-nos importante destacar os achados referentes aos seguintes factores: idade, sexo, exposição antenatal ao fumo de tabaco, contacto com animais, atopia familiar, antecedentes pessoais de eczema e índice preditivo de asma.

Idade

O perfil das citocinas detectadas à superfície da mucosa nasal não se modificou com a idade dos doentes estudados. No ambiente intrauterino sabe-se que predominam as citocinas da via Th2, o que contribui para impedir que o embrião e o feto sejam considerados como um aloenxerto (Lewis 2006). Esse perfil Th2 mantém-se no recém-nascido, sendo gradualmente substituído ao longo da infância por uma imunidade predominantemente de tipo Th1, em função do contacto repetido com agentes infecciosos. Em crianças excessivamente protegidas da influência do meio ambiente nas quais coexista alguma tendência prévia, não se verificará este processo de inversão fisiológica, sendo favorecido o aparecimento de doenças alérgicas (Romagnani 2004, Bloomfield 2006, Liu 2006, Schaub 2006, Verceli 2006).

Essa modificação do perfil das diferentes citocinas em função da idade não foi evidente nos nossos doentes, sendo legítimo especular que a evolução temporal da imunidade local é multifactorial (Bloomfield 2006, Liu 2006, Schaub 2006, Verceli 2006).

Sexo

Uekert (2006), entre outros, admite diferenças entre os mecanismos imunitários nos rapazes e nas raparigas, mesmo antes da puberdade. Estes mecanismos poderão relacionar-se com factores genéticos precoces, que condicionariam uma maior susceptibilidade dos lactentes do sexo masculino a algumas doenças infecciosas. A esse respeito não detectámos na amostra qualquer diferença, pelo que admitimos que as eventuais discrepâncias existentes entre os sexos poderão ser devidas a outros mecanismos não imunes, como, por exemplo, os diferentes ritmos de desenvolvimento anatómico, estrutural e funcional (Rosado-Pinto 2003, Boezen 2004 e Bacharier 2008).

Exposição antenatal a fumo de tabaco

Autores como Bracken (2002), Noakes (2003), Schaub (2006), Prescott (2006), Felezensko (2006), Le Soeuf (2006), Diaz-Sanchez (2006), Singh (2007) ou Piippo-Savolainen (2008) admitem que o contacto antenatal com o fumo do tabaco poderá, além da influência sobre o desenvolvimento anatómico e funcional do aparelho respiratório, ter repercussões sobre a diferenciação imunológica das vias respiratórias. Tal não foi verificado na presente investigação, no que respeita às vias estudadas.

Este tópico merece, pois, ser avaliado de forma aprofundada, usando eventualmente outras metodologias de investigação.

Contacto com animais

Os defensores da hipótese higiénica, como, entre outros, Romagnani (2004), Bloomfield (2006) ou Liu (2006), admitem que uma convivência precoce e continuada com animais domésticos levaria ao contacto com endotoxinas e agentes microbianos que favoreceriam o desenvolvimento da imunidade de tipo Th1 e, conseqüentemente, a diminuição do risco de manifestações alérgicas subsequentes, nomeadamente as que cursam com manifestações clínicas a nível do aparelho respiratório.

Ao contrário do referido por Taussig (2003), de Meer (2005), Waser (2005), Campo (2006) ou Duramad (2006), não foi possível detectar quaisquer diferenças a nível da imunidade local, independentemente do contacto com animais domésticos. Não podemos retirar, portanto, ilações que confirmem ou infirmem estas hipóteses.

Atopia familiar

A presença de atopia num elemento da família nuclear constitui um dado anamnésico importante na avaliação de uma criança com sibilância. Mesmo sem sensibilização demonstrável, sabe-se que os filhos dos asmáticos têm risco aumentado de episódios de pieira recorrente (Gold 1999, Sherriff 2001, Fonseca 2003, Taussig 2003, Campo 2006, Prescott 2006, Janssen 2007, Bacharier 2008). Diversos autores, como Bracken (2002), Heaton (2005), Ermers (2006) e Stensballe (2006), atribuem essa susceptibilidade a

diferentes respostas imunes a nível das citocinas locais, que seriam geneticamente determinadas.

A maior incidência de sibilância recorrente nos filhos de mães atópicas foi também observada neste estudo. Não nos foi possível, no entanto, associá-la aos dados decorrentes do estudo da imunidade local: nas crianças estudadas, os perfis de expressão dos genes das diferentes citocinas foram idênticos e independentemente dos antecedentes familiares de atopia. Nesta perspectiva, afigura-se-nos pertinente estudar, no futuro, outros mecanismos implicados nestes fenómenos.

Eczema atópico

A presença de eczema atópico nos primeiros anos de vida, reconhecidamente uma das manifestações iniciais da doença alérgica, traduz alterações imunitárias precoces associadas a estimulação preferencial das vias Th2, como é o caso, nomeadamente da síntese de IgE específica para determinados alérgenos (Rosado-Pinto 2003).

Nos lactentes estudados, e com a metodologia utilizada, não foram detectadas quaisquer diferenças entre as crianças com e sem eczema, no que diz respeito à imunidade da mucosa nasal. Assim, é-nos possível admitir que eventuais alterações relacionadas com respostas de tipo alérgico venham a surgir mais tardiamente nas vias respiratórias destes indivíduos.

Índice preditivo de asma

Para avaliar, aos três anos de idade, a probabilidade de progressão futura para asma brônquica usámos o Índice Preditivo de Asma (IPA), desenvolvido por Castro-Rodríguez e colaboradores (2006). Verificámos que as crianças com IPA positivo, bem como as que, pelo contrário, apresentavam índice negativo aos 3 anos, tinham tido, na avaliação inicial, perfis sobreponíveis de expressão génica de citocinas nasais. Não nos foi, assim, possível detectar padrões precoces na imunidade local com correlação com esse índice preditivo da progressão para asma brônquica. Para a prossecução desse objectivo seriam, eventualmente, necessários mais estudos.

DO MODELO MULTIVARIADO

Dos factores associados a sibilância recorrente

O modelo multivariado construído para avaliar o risco de sibilância recorrente incluiu todas as variáveis que foram consideradas significativas e independentes no modelo univariado.

Foram, desta forma, confirmadas em geral as conclusões anteriores. Os seguintes parâmetros foram reconhecidos como estando associados ao aparecimento de sibilância recorrente após uma primeira bronquiolite, legitimando a partir deste momento, a sua classificação como **factores de risco** para essa situação:

- Idade inferior na altura do primeiro episódio
- Episódio inicial com critérios de maior gravidade
- Contacto com fumo de tabaco durante a gravidez e / ou no domicílio
- Mãe com atopia
- Identificação de vírus no decurso do primeiro episódio de bronquiolite

Foi confirmado como **factor protector**:

- Presença de febre

Assim, com base nos resultados do presente estudo, determinámos que o risco relativo de aparecimento de sibilância recorrente numa determinada criança, no momento de um primeiro episódio de bronquiolite, se quantificaria da seguinte forma:

- a) idade inferior a seis meses (OR: 3,8 - IC95%: 1,8-9,1);
- b) presença de atopia materna (OR: 3,9 - IC95%: 1,5-10,3);
- c) contacto passivo com fumo de tabaco (OR: 2,4 - IC95%: 1,0-5,8);
- d) identificação de VSR (OR: 3,5 - IC95%: 1,4-8,7);
- e) ausência de febre (OR: 4,7 - IC95%: 1,8-11,8)
- f) índice de gravidade mais elevado (OR: 1,2 - IC95%: 1,1-1,4).

A exposição ao fumo de tabaco e o excesso de contactos sociais com crianças pequenas são, de todos estes factores de risco, os únicos evitáveis. Desta forma, o aconselhamento por parte do clínico de alterações simples no estilo de vida das famílias poderá contribuir para a diminuição da prevalência de sibilância recorrente nos primeiros anos de vida (Ball 2000, Garcuño 2003, Cifuentes 2003, Silvestri 2004, Martinez 2005, Friedlander 2005, Phaybouth 2006, Eder 2006, Landau 2006).

Dos factores que influenciaram a expressão das citocinas nasais

O modelo multivariado que construímos para estudar o efeito de cada parâmetro sobre o comportamento das diferentes citocinas permitiu classificar como **factores de risco** para o predomínio das vias Th2 ou Th1, os seguintes parâmetros:

- Factores associados a predomínio Th2
 - Contacto com fumo de tabaco no domicílio
- Factores associados a predomínio Th1
 - Exposição quotidiana a outras crianças
 - Alimentação com leite materno
 - Isolamento de vírus respiratórios no primeiro episódio de bronquiolite

Contacto com fumo de tabaco no domicílio

A exposição ao fumo de tabaco no domicílio determinou predomínio Th2 em 2,3 vezes (IC95%: 1,1-4,6), alteração condicionada principalmente pela diminuição de expressão de IFN- γ .

Esta alteração imunitária associada à exposição ao fumo do tabaco no domicílio poderá, indirectamente, associar-se à hiperreactividade brônquica. Autores como Barrett (2002), Silvestri (2004), Friedlander (2005), Phaybouth (2006) e Prescott (2006) têm referido mecanismos semelhantes, quer em humanos, quer em animais de experiência ou culturas celulares. Será desejável a realização de mais estudos para um esclarecimento mais completo e definitivo destas relações.

Contacto com outras crianças

Nas crianças expostas quotidianamente a outras (quer porque tivessem irmãos, quer nos casos em que frequentassem o infantário), detectámos, no momento da bronquiolite inicial, um predomínio Th1 a nível da imunidade nasal.

A probabilidade de a imunidade local destas crianças se orientar preferencialmente no sentido Th1 é, assim, de 3,1 vezes superior às não expostas (IC95%: 1,4-6,5). Este facto poderá-se-á dever a uma maior estimulação prévia (por vírus ou endotoxinas) que condicionaria uma resposta mais eficaz contra estas infecções. Os estudos de Stokes-Peebles (2004), Friedlander (2005), de Meer (2005), Nafstad (2005), Martinez (2005), Bloomfield (2006), Gern (2006), Eder (2006), Schaub (2006), Landau (2006), Cortés-Alvarez (2007) ou Lee (2007) apontam igualmente neste sentido. Ball e colaboradores (2000) demonstraram, inclusivamente, que estas crianças teriam, no futuro, um risco inferior de evolução para asma e atopia.

Esta estimulação imunitária das vias Th1 pelo contacto com outras crianças evidenciou ter, nesta investigação, significado estatístico inquestionável. Estas observações merecem estudos mais aprofundados no futuro.

Leite materno

No grupo de crianças que beneficiaram de aleitamento materno exclusivo até aos três meses de idade verificámos menor produção de IL-13, o que correspondeu a um predomínio das vias Th1. Este achado, já verificado no modelo univariado, manteve-se com significado estatístico na análise multivariada, ou seja, nas crianças alimentadas ao peito verificou-se predomínio imunitário de tipo Th1 na ordem de 1,2 vezes (IC95%: 1,1-1,4) superior às restantes. Este aspecto poderá, em tais circunstâncias, proporcionar mais eficiência no combate às infecções virais (Oddy 2002, Wills-Karp 2004, Obihara 2005, Paricio-Telayero 2006, Chantry 2006).

No entanto não encontrámos, nestas crianças, menor incidência subsequente de sibilância recorrente até à idade de 36 meses. Admitimos que o predomínio Th1 associado ao aleitamento materno poderá, todavia, ter implicações mais tarde, nomeadamente na protecção contra a asma e outras doenças atópicas nos anos subsequentes. Os trabalhos de Oddy (2002), Wills-Karp (2004), Friedman (2005), Kull (2005) ou Obihara (2005), entre outros, apontam nesse sentido, o que nos permite admitir que esse aspecto merecerá maior investigação no futuro.

Vírus respiratórios

No presente estudo, a identificação de vírus respiratórios (nomeadamente VSR) no episódio inicial aumentou em 4,0 vezes (IC95%: 1,3-11,9) a probabilidade de resposta imune de tipo Th1. Este é, efectivamente, o perfil encontrado na maior parte das infecções virais (Bont 2002, Hacking 2002, Legg 2003, Joshi 2003, Kim 2003, van Woensel 2003, de Waal 2003, Copenhaver 2004, Garofalo 2004, Schauer 2004, Romagnani 2004, McNamara 2004, Spann 2004, Teixeira 2005, Tryen 2006, Vercelli 2006, Culley 2006, Stern 2007, Lazzaro 2007, Sutton 2007, Bennett 2007).

Autores como Stokes-Peebles (2005), Henderson (2005), Midulla (2006), Prescott (2006) ou Pinto (2006) descreveram, pelo contrário, que na infecção por VSR, se daria uma estimulação preferencial da via Th2, facto que não detectámos nesta investigação.

Numa perspectiva mais abrangente, os estudos de Gern (2004), Psarras (2004), Tripp (2005) ou Braciale (2005) sugerem a existência de subpopulações de VSR que desencadeariam respostas imunes de sentidos opostos, conforme esta fosse determinada pela proteína vírica F (de tipo Th1) ou pela proteína G (de tipo Th2).

A infecção por VSR tem vindo a ser estudada de forma sistemática e ininterrupta desde a identificação desse agente há mais de 50 anos. É de referir, contudo, que o seu comportamento biológico não é se encontra ainda completamente compreendido. Com efeito, da interacção com o hospedeiro resultam respostas imunológicas complexas, que têm dificultado a investigação e, nomeadamente, a síntese de vacinas (Becker 2006, Braciale 2005, Pinto 2006, Stokes-Peebles 2005).

Os restantes factores associados a sibilância recorrente no modelo univariado, como o grau de escolaridade materna, a necessidade de internamento hospitalar, o número de linfócitos e de eosinófilos, não mantiveram significado no modelo multivariado, pelo que não os considerámos como tendo influência sobre o comportamento das citocinas a nível nasal. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram, em geral, diferenças muito subtis que deverão ser validadas em estudos subsequentes.

Em suma, e integrando estes diferentes modelos, como está representado graficamente na figura 53, a recorrência de sibilância nos primeiros anos de vida ocorre fundamentalmente em função de factores que prejudiquem o desenvolvimento estrutural ou funcional do aparelho respiratório ou diminuam o calibre das vias aéreas. Os factores imunitários locais, nomeadamente o predomínio Th2, poderão ter algum papel em lactentes que sofram um primeiro episódio de bronquiolite após os 6 meses de idade.

CONCLUSÕES

Em obediência aos objectivos inicialmente estabelecidos para este estudo, são apresentadas as suas principais conclusões: primeiro, quanto aos factores de risco de sibilância recorrente após bronquiolite aguda; de seguida, as respeitantes aos factores que influenciaram a expressão génica das citocinas da mucosa local.

1. Numa amostra de 152 crianças após um primeiro episódio de bronquiolite aguda verificou-se, em 76 casos (50%), sibilância recorrente até aos três anos de idade, salientando-se que as características demográficas da amostra em análise não foram significativamente diferentes das da população-alvo.
2. A idade mais baixa do primeiro episódio de bronquiolite aguda associou-se a maior probabilidade de recorrência de sibilância nos três primeiros anos de vida.
3. A exposição passiva ao fumo de tabaco (durante a vida intrauterina ou após o nascimento) constituiu um dos principais determinantes de sibilância recorrente.
4. A presença de antecedentes de atopia na mãe foi mais frequente entre os lactentes com pieira recorrente, mesmo na ausência de sensibilização alérgica demonstrável.
5. A gravidade do primeiro episódio de bronquiolite teve relação directa com a recorrência de sibilância.
6. O primeiro episódio de bronquiolite aguda evoluiu mais frequentemente em apirexia nas crianças que vieram a ter sibilância recorrente.
7. Nos casos em que foram identificados vírus respiratórios (sobretudo VSR) nas secreções nasais verificou-se maior probabilidade de sibilância recorrente nos anos seguintes.
8. Após a idade de seis meses, as crianças em que, no decorrer de um primeiro episódio de bronquiolite foi possível evidenciar predomínio da imunidade nasal de tipo Th2 (traduzido pela expressão mais elevada de IL-4) tiveram maior incidência de sibilância recorrente.

9. O estudo do comportamento de quatro citocinas nasais (duas representativas da via Th1 e duas da via Th2) permitiu verificar diferenças ténues mas com significado estatístico quantitativo, traduzidas nos seguintes achados:
- 9.1 O contacto com fumo de tabaco no domicílio foi o determinante mais representativo do predomínio Th2.
 - 9.2 As crianças com irmãos ou que frequentaram o infantário apresentaram predomínio da imunidade de tipo Th1.
 - 9.3 A alimentação exclusiva com leite materno até aos três meses de idade associou-se ao predomínio da via Th1.
 - 9.4 Da mesma forma, o isolamento de vírus respiratórios no decorrer de um primeiro episódio de bronquiolite aguda associou-se ao predomínio da via Th1.

RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES

Os resultados deste estudo permitem considerar algumas recomendações clínicas em relação à abordagem inicial e ao acompanhamento subsequente de crianças após um primeiro episódio de bronquiolite aguda:

1. Pensamos ser fundamental objectivar, na prática clínica, a gravidade da bronquiolite aguda, através da generalização de um índice semelhante ao utilizado neste estudo. Esse procedimento consideraria parâmetros clínicos objectivos e padronizados, diminuindo o peso relativo da determinação isolada de SpO₂ no encaminhamento destas crianças.
2. A pesquisa sistemática de Ag víricos nas secreções nasais, num primeiro episódio de bronquiolite aguda, seria importante uma vez que, além de rendibilizar as medidas de isolamento iniciais, poderia contribuir para definir o prognóstico a longo prazo. Não recomendamos, pelo contrário, a realização concomitante de outros exames complementares de diagnóstico como radiografia do tórax ou leucograma.
3. Os resultados do presente estudo reforçam algumas recomendações clínicas habituais em consultas de saúde infantil, como o aleitamento materno, a limitação de contactos sociais em lactentes com idade inferior a seis meses bem como a evicção tabágica durante a gravidez e após o nascimento.
4. O aprofundamento da investigação básica nas áreas da virologia e da imunologia permitirá, pela síntese de novos fármacos e vacinas eficazes, melhorar a prática clínica e a qualidade de vida dos doentes.

Por outro lado, este estudo sugere a prossecução doutras linhas de investigação com possíveis implicações na prática clínica, e designadamente na melhoria da sua qualidade, a saber:

1. Efectuar estudos dirigidos para esclarecer os mecanismos pelos quais a atopia materna influencia o estado de sibilância recorrente precoce em crianças não sensibilizadas
2. Aprofundar estudos imunológicos locais na população com idade superior a seis meses a fim de verificar, nomeadamente, se se confirma o predomínio Th2 encontrado no presente estudo.
3. Validar o tipo de resposta à infecção por VSR encontrada neste estudo (Th1) que contraria outros autores
4. Realizar estudos citológicos em material obtido da mucosa nasal, com o objectivo de identificar a origem celular das diversas citocinas identificadas
5. Estudar experimentalmente de modo controlado e aleatório, em cultura, animais de experiência ou voluntários, com o objectivo de avaliar a verdadeira influência do fumo de tabaco sobre a imunidade local do aparelho respiratório
6. Esclarecer quais as populações celulares da mucosa nasal que se modificam por influência do contacto com vírus e endotoxinas
7. Quantificar a influência do fumo de tabaco sobre as crianças, tendo como base doseamentos de cotinina em produtos biológicos
8. Reavaliar as crianças desta população que tiveram índice preditivo de asma positivo e correlacionar a sua evolução clínica com os fenómenos observados precocemente.

RESUMO

Introdução: a bronquiolite aguda afecta 30 a 60% das crianças saudáveis até ao terceiro aniversário. Destas, 50% evoluem para sibilância recorrente, com consequências pessoais, familiares e sociais relevantes.

Objectivos: identificação de parâmetros clínicos e laboratoriais associados à sibilância recorrente em crianças saudáveis. A detecção da actividade local de quatro citocinas intervenientes nas vias imunológicas Th1 ou Th2 permitiu, igualmente, o estudo do respectivo comportamento em função dos referidos parâmetros.

Material e Métodos: estudo prospectivo de coorte, efectuado no serviço de urgência pediátrica do HSFX no Inverno 2004/2005. Recrutada amostra de conveniência de 188 lactentes de idade inferior a 24 meses e diagnóstico de bronquiolite aguda. Excluídos portadores de doença crónica, ex-prematuros e os doentes sujeitos a corticoterapia nas duas semanas anteriores. A todos foi feito questionário padronizado, exame clínico e estratificação da gravidade através de índice validado. Na mucosa nasal, foram pesquisados Ag víricos e estudada a expressão génica de quatro citocinas - representativas da via Th1 (IFN- γ e IL-12) ou Th2 (IL-4 e IL-13). Esta determinação foi efectuada por RT-PCR, no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Sul. Durante o seguimento, em consulta de pneumologia pediátrica até à idade de 36 meses, foram excluídos os seguintes casos: patologia anatómica ou funcional que justificasse sibilância recorrente, valores totais de IgE elevados, Phadiatop® positivo ou défice de IgG, IgA ou IgM. Os resultados foram estudados por estatística descritiva, análise univariada e multivariada. Foi considerado com significado estatístico, em todas as análises, o valor de $p < 0,05$.

Resultados: das 188 crianças recrutadas, foram excluídas 36 (principalmente por identificação de outras causas de sibilância recorrente). Da amostra final de 152 doentes, 76 (50%) foram considerados sibilantes e 76 não sibilantes. Os seguintes parâmetros à entrada relacionaram-se com a evolução para sibilância recorrente: idade inferior a 6 meses (OR: 3,8; IC95% 1,8-9,1); exposição ao fumo de tabaco na vida intrauterina (OR: 2,5; IC95% 1,2-5,2) ou após o nascimento (OR: 2,4; IC95% 1,0-5,8); atopia materna (OR: 4,0; IC95% 1,5-10,3); maior gravidade (OR: 1,2; IC95% 1,1-1,4); apirexia (OR: 4,7; IC95% 1,8-11,8); identificação de vírus (OR: 3,5; IC95% 1,4-8,7); predomínio imunitário de tipo Th2 em lactentes com idade superior a seis meses (OR: 1,3; IC95% 1,0-1,7). Verificou-se predomínio Th1 na mucosa nasal das crianças com irmãos ou que frequentavam o infantário (OR: 3,1; IC95% 1,4-6,5); nas amamentadas (OR: 1,2; IC95% 1,1-1,4) e naquelas em que se identificaram Ag víricos (OR: 4,0; IC95% 1,3-11,9). O contacto com fumo de tabaco no domicílio foi o determinante mais importante de predomínio Th2 (OR: 2,3; IC95% 1,1-4,7).

Discussão e Conclusões: Foram considerados factores de risco para sibilância recorrente em lactentes saudáveis: idade inferior no momento do primeiro episódio de bronquiolite; exposição passiva (antenatal ou pós-natal) ao fumo de tabaco; antecedentes maternos de atopia; primeiro episódio com maior gravidade, sem febre e com identificação de Ag víricos nas secreções nasais. Os resultados do presente estudo reforçam as recomendações usuais de aleitamento materno, limitação de contactos sociais em lactentes e evicção tabágica durante a gravidez e após o nascimento.

ABSTRACT

Introduction: acute bronchiolitis affects 30 to 60% of healthy infants up to their third anniversary. Of these, half have recurrent episodes of wheezing, with relevant personal, familiar and social consequences.

Objectives: identify clinical and laboratory items associated with recurrent wheezing in healthy children. Local activity of four cytokines was also detected, allowing detection of Th1 or Th2 dominance and their behaviour according to same parameters.

Material and Methods: cohort prospective study, based in the Pediatric Emergency Department of Sao Francisco Xavier Hospital during 2004/2005 winter. We gathered a group of 188 infant aged less than 24 months and the diagnosis of acute bronchiolitis. Exclusion criteria were: chronic disease, ex-preterm and patients who have received corticotherapy in the previous two weeks. Every patient was submitted to standard questionnaire, clinical exam and a severity classification according to a validated score. Viral Ag and genetic expression of four cytokines were determined: two represented Th1 pathway (IFN- γ and IL-12) and two represented Th2 pathway (IL-4 and IL-13). This study was made by RT-PCR in the Molecular Biology Laboratory of the Centro de Histocompatibilidade do Sul. Patients were subsequently followed in paediatric pneumology consultation until they were 36 months old. Exclusion criteria at these phase were: anatomical or functional disease that otherwise explained recurrent wheezing; elevated total IgE, positive Phadiotop™, low levels of IgG, IgM and IgA. Results were analyzed by descriptive statistics and univariate and multivariate models. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results: 188 infants were admitted to the study. Of these, 36 were excluded, mainly because additional causes of respiratory disease were diagnosed. In the final sample (n=152), 76 (50%) were considered recurrent wheezing. The following items, detected at inclusion date were found to be significantly associated with recurrent wheezing: age lower than six months (OR=3.8; IC95%: 1.8-9.1); in-uterus (OR=2.5; IC95%: 1.2-5.2) or postnatal (OR=2.4; IC95%: 1.0-5.8) exposure to tobacco smoke; maternal history of atopic disease (OR=4.0; IC95%: 1.5-10.5); higher severity score (OR=1.2; IC95%: 1.1-1.4); absence of fever (OR=4.7; IC95%: 1.8-11.8); identification of viral Ag in nasal secretions (OR=3.5; IC95%: 1.4-8); predominance of Th2 immune pathways in infants younger than six months old (OR=3.8; IC95%: 1.8-9.1). We additionally studied the way these different items influenced nasal immunity and found out that Th1 immune pathways were associated with existence of brothers or attendance to day-care centres (OR=3.1; IC95%: 1.4-6.5); breastfeeding (OR=1.2; IC95%: 1.1-1.4); and identification of viral Ag (OR=4.0; IC95%: 1.3-11.9). Exposure to tobacco smoke at home was associated with Th2 predominance (OR=2.3; IC95%: 1.1-4.7).

Discussion and Conclusions: the following items were considered risk factors for recurrent wheezing in healthy infants: lower age at the first episode of acute bronchiolitis; passive antenatal or postnatal exposure to tobacco smoke; maternal history of atopic disease; higher score of severity, absence of fever and viral identification during the first episode of bronchiolitis. Results from this study support usual recommendations of breastfeeding, limitation of social contacts in infants and tobacco avoidance during pregnancy and infancy.

RESUMEN

Introducción: La bronquiolitis aguda afecta al 30 – 60% de los niños saludables hasta el tercer año. De éstas, 50% evolucionan para sibilancia recurrente, con consecuencias personales, familiares y sociales relevantes.

Objetivos: Identificación de parámetros clínicos y de laboratorio asociados a la sibilancia recurrente en niños saludables. La detección de actividad local de cuatro citoquinas que intervienen en las vías inmunológicas Th1 o Th2 permitió, igualmente, el estudio del respectivo comportamiento en función de los referidos parámetros.

Material y Método: Estudio prospectivo de cohorte, efectuado en el servicio de urgencias pediátricas del (Hospital San Francisco Xavier) HSFx durante el invierno del 2004/2005. Reunida una muestra de conveniencia de 188 lactantes de edad inferior a 24 meses con diagnóstico de bronquiolitis aguda. Fueron excluidos los portadores de enfermedad crónica, ex-prematuros y los enfermos sujetos a corticoterapia en las dos semanas anteriores. A todos se les fue realizado un cuestionario padronizado, examen clínico y estratificación de la gravedad a través de un índice validado. En la mucosa nasal, se investigó la presencia de Ag víricos y estudiada la expresión genética de cuatro citoquinas representativas de la vía Th1 (IFN- γ e IL-12) o Th2 (IL-4 e IL-13). Esta determinación fue efectuada por RT-PCR, en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Histocompatibilidad del Sur. Durante el seguimiento, en consulta de neumología pediátrica hasta la edad de 36 meses, fueron excluidos los siguientes casos: patología anatómica o funcional que justificase sibilancia recurrente, cifras totales de IgE elevadas, Phadiatop[®] positivo o déficit de IgG, IgA o IgM. Los resultados fueron estudiados por estadística descriptiva, análisis univariada y multivariada. Fue considerado con significado estadístico, en todos los análisis, el valor de $p < 0,05$.

Resultados: De los 188 niños incluidos, fueron excluidos 36 (principalmente por identificación de otras causas de sibilancia recurrente). De la muestra final de 152 enfermos, 76 (50%) fueron considerados sibilantes y 76 no sibilantes. Los siguientes parámetros a la entrada se relacionan con la evolución para sibilancia recurrente: edad inferior a 6 meses (OR:3,8; IC95% 1,8-9,1); exposición al humo de tabaco en la vida intrauterina (OR:2,5; IC95% 1,2-5,2); o después del nacimiento (OR:2,4; IC95% 1,0-5,8); atopía materna (OR:4,0; IC95% 1,5-10,3); mayor gravedad (OR:1,2; IC95% 1,1-1,4); apirexia (OR:4,7; IC95% 1,8-11,8); identificación del virus (OR:3,5; IC95% 1,4-8,7); predominio inmunitario de tipo Th2 en lactantes con edad superior a seis meses (OR:1,3; IC95% 1,0-1,7). Se verificó predominio de Th1 en la mucosa nasal de los niños hermanos o los que frecuentaban la guardería (OR: 3,1; IC95% 1,4-6,5); en las amamantadas (OR: 1,2; IC95% 1,1-1,4); y en aquellas que se identificaran AG víricos (OR: 4,0; IC95% 1,3-11,9); El contacto con el humo de tabaco en el domicilio fue el determinante mas importante de predominio Th2 (OR: 2,3; IC95% 1,1-4,7);

Conclusiones: Fueron considerados factores de riesgo para sibilancia recurrente en lactantes saludables: edad inferior en el momento del primer episodio de bronquiolitis; exposición pasiva (antenatal o postnatal) al humo de tabaco; antecedentes maternos de atopía; primer episodio con mayor gravedad, sin fiebre y con identificación de Ag víricos en las secreciones nasales. Los resultados del presente estudio refuerzan las recomendaciones usuales de lactación materna, limitación de contactos sociales en lactantes y evitar fumar durante el embarazo y después del nacimiento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A Península Ibérica em Números 2007. Instituto Nacional de Estatística (INE). Lisboa, 2007.
2. Al-Shawwa B, Al-Huniti N, Abu-Hasan M, et al. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and risk of subsequent wheezing: a matter of severity. *Pediatr Asthma Allergy Immunol* 2006; 19(1): 26-30.
3. Aoyagi M, Shimojo N, Sekine K, et al. Respiratory syncytial virus infection suppresses IFN- γ production of $\gamma\delta$ T cells. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 312-317.
4. Arora R, Mikita CP. The Canadian Childhood Asthma Primary Prevention Study: Outcomes at 7 years of age. *Pediatrics* 2006; 118: S9-S19.
5. Asher MI, Montefort S, Björkstén B and the ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases I and III repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet* 2006; 368 (9537): 733-743.
6. Azevedo I, de Blic J, Scheinmann P, et al. Enhanced arachidonic acid metabolism in alveolar macrophages from wheezy infants. Modulation by dexamethasone. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(4 Pt 1): 1208-1214.
7. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, et al. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008; 63: 5-34.
8. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, et al. Siblings, day-care attendance and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343:538-43.
9. Baraldi E, Carraro S. Exhaled NO and breath condensate. *Pediatric Respiratory Reviews* 2006; 7S: S20-S22.
10. Barrett EG, Wilder JA, March TH, et al. Cigarette smoke-induced airway hyperresponsiveness is not dependent on elevated immunoglobulin and eosinophilic inflammation in a mouse model of allergic airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1410-1418.
11. Becker Y. Respiratory syncytial virus evades the human adaptative immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy – a review. *Virus Genes* 2006; 33: 235-252.
12. Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of Infectious Diseases* 2007; 195: 1532 – 1540
13. Bergoin C, Gosset P, Lamblin C, et al. Cell and cytokine profile in nasal secretions in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2002; 1: 110-115.
14. Bisgaard H, Le Roux P, Bjamer D, et al. Budesonide / formoterol maintenance plus reliever therapy: a new strategy in pediatric asthma. *Chest* 2006; 130(6): 1733-1743.
15. Bisgaard H, Szeffler S. Long-acting β 2 agonists and paediatric asthma. *The Lancet*. 2006; 367(9507):286-288.
16. Bisgaard H. A randomised trial of montelukast in respiratory syncytial virus postbronchiolitis wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 379-383.
17. Bisgaard H, Szeffler S. Prevalence of asthma-like symptoms in young children. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42 (8): 723-8.
18. Bitko V, Garmon NE, Cao T, et al. Activation of cytokines and NF-kappa B in corneal epithelial cells infected by respiratory syncytial virus: potential relevance in ocular inflammation and respiratory infection. *BMC Microbiology* 2004; 4:28-38.
19. Black CP. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respiratory Care* 2003; 48: 209-233.
20. Bloomfield SF, Stanwell-Smith R, Crevel RWR, et al. Too clean or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene. *Clinical and Experimental Allergy* 2006; 36: 402-425.
21. Boelen A, Kwakkel J, Barends M, et al. Effect of lack of interleukin-4, interleukin-12, interleukin-18 and interferon- γ receptor on virus replication, cytokine response and lung pathology during respiratory syncytial virus infection in mice. *Journal of Medical Virology* 2002; 66:552–560.
22. Boezen HM, Jansen DF, Postma DS. Sex and gender differences in lung development and their clinical significance. *Clin Chest Med* 2004; 25(2):237-45.
23. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, et al. Local interferon- γ levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J Infect Dis* 2001; 184 (3): 355-358.
24. Bont L, Aalderen WM, Kimpen JL. Long-term consequences of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Paediatr Respir Rev* 2000;1: 221-227.
25. Bont L, Kimpen JL. Immunological mechanisms of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Intensive Care Med* 2002; 28: 616-621.
26. Bont L, Heijnen AK, van Aalderen, et al. Monocyte IL-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in a one-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1518-1523.

27. Borrego LM, Pinto PL, Neuparth N, et al. Espirometria pré-escolar: estudo de uma população – que implicações? *Rev Port Imunoalergologia* 2005; 13 (3): 225-231.
28. Bowling A. Mode of questionnaire administration can have serious effects on data quality. *J Public Health (Oxf)*. 2005; 3: 281-91.
29. Braciale TJ. Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 141-146.
30. Bracken MB, Belanger K, Cookson WO, et al. Genetic and perinatal risk factors for asthma onset and severity: A review and theoretical analysis. *Epidemiologic Reviews* 2002; 24: 176-189.
31. Bradley JP, Bacharier LB, Bonfiglio J, et al. Severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis is affected by cigarette smoke exposure and atopy. *Pediatrics* 2005; 115: e7-e14.
32. Brooks AM, Byrd RS, Weitzman M. Impact of low birth weight on early childhood asthma in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001; 155(3): 401-6.
33. Brouard J, Freymuth F, Bach N, et al. Infections précoces dans l'enfance: amies ou enemies? *Archives de Pédiatrie* 2004; 11: 98s-102s.
34. Brown VG, Ennis M. T cell cytokine production in childhood asthma. *Current Respiratory Medicine Reviews* 2005; 1: 1-6.
35. Brussee JE, Smit HA, van Strieten RT, et al. Allergen exposure in infancy and the development of sensitization, wheeze, and asthma at 4 years. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 946-952.
36. Brussee JE, Smit HA, Kerkhof M, et al. Exhaled nitric oxide in 4-year-old children: relationship with asthma and atopy. *Eur Respir J* 2005; 25: 455-461.
37. Bryan DL, Hart PH, Forsyth KD, et al. Immunomodulatory constituents of human milk change in response to infant bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2007(6): 495-502.
38. Bush A. Diagnosis of asthma in children under five. *Primary Care Respiratory Journal* 2007; 16 (1): 7-15.
39. Busse WW, Lemanske RF. Advances in Immunology: Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344: 350-362.
40. Campo P, Kalra HK, Levin L, et al. Influence of dog ownership and high endotoxin on wheezing and atopy during infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1271-1278.
41. Carroll KC, Gebretsadik T, Griffin MR, et al. Maternal asthma and maternal smoking are associated with increased risk of bronchiolitis during infancy. *Pediatrics* 2007; 119 (6): 1104-1112.
42. Castro-Rodríguez JA. Asociacion entre asma y infecciones virales. *An Pediatr (Barc)*. 2007; 67(2): 161-168.
43. Castro-Rodríguez. Assessing the risk of asthma in infants and pre-school children. *Arch Bronconeumol*. 2006; 42(9): 453-456.
44. Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Wright A, et al. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1403-1406.
45. CDC Centers for Disease Control and Prevention. Overview of Influenza Surveillance in the United States 2007. www.cdc.gov/flu/weekly/fluactivity.htm
46. Chantry CJ, Howard CR, Aunger P. Full breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infections in US children. *Pediatrics* 2006; 117: 425-432.
47. Chavez-Bueno S, Mejias A, Welliver RC. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: current and future strategies for treatment and prophylaxis. *Treat Respir Med*. 2006;5(6):483-94.
48. Cheung TK, Poon LL. Biology of influenza A virus. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1102: 1-25.
49. Chong-Neto HJ, Rosario N, Dela Bianca AC, et al. Validation of questionnaire for epidemiologic studies on wheezing in infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 86-87.
50. Christen U, von Herrath G. Infections and autoimmunity – good or bad? *The Journal of Immunology* 2005; 174: 7481-7486.
51. Chung HL, Park HJ, Kim SY, et al. Age-related difference in immune responses to respiratory syncytial virus infection in young children. *Pediatric Allergy and Immunology* 2007; 18 (2): 94-99.
52. Cifuentes L, Caussade S, Villagrán C, et al. Risk factors for recurrent wheezing following acute bronchiolitis: a 12-month follow-up. *Pediatric Pulmonology* 2003; 36: 316-321.
53. Copenhaver CC, Gern JE, Li Z, et al. Cytokine response patterns, exposure to viruses, and respiratory infections in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170(2): 175-180.
54. Cortés-Alvarez N, Martín Mateos MA, Plaza Martín AM, et al. Risk factors of developing asthma in children with recurrent wheezing in the first three years of life. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007; 35(6): 228-231.
55. Culley FJ, Pennycook AM, Tregoning JS, et al. Differential chemokine expression following respiratory virus infection reflects Th1- or Th2-biased immunopathology. *J Virol*. 2006; b80: 4521 – 4527.
56. de Silva A, Jones PW, Spencer SA. Does human milk reduce infection rates in preterm infants? A systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89(6): F509-F513.
57. de Meer G, Janssen NA, Bruekreef B. Early childhood environment related to microbial exposure and the occurrence of atopic disease at school age. *Allergy*. 2005; 60: 619-625.
58. de Waal L, Koopman LP, van Benten IJ, et al. Moderate local and systemic respiratory syncytial virus - specific T-cell responses upon mild or subclinical RSV infection. *Journal of Medical Virology* 2003; 70: 309-318.

59. Deffrasnes C, Hamelin ME, Boivin G. Human metapneumovirus. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007 (2): 213-21.
60. Diaz-Sanchez D, Rumold R, Gong Jr R. Challenge with environmental tobacco smoke exacerbates allergic airway disease in human beings *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(2): 441-446.
61. du Prel X, Krämer U, Behrendt H, et al. Preschool children's health and its association with parental education and individual living conditions in East and West Germany *BMC Public Health* 2006; 6:312-324.
62. Duramad P, Harley K, Lipsett M, et al. Early environmental exposures and intracellular Th1 / Th2 cytokine profiles in 24-month-old children living in an agricultural area. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114: 1916-1922.
63. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006; 355(21): 2226-2235.
64. Elias JA, Lee CG, Zheng T, et al. Interleukin-13 and leukotrienes: an intersection of pathogenetic schema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 401-404.
65. Epton MJ, Town GI, Ingham T, et al. The New Zealand Asthma and Allergy Cohort Study (NZA²CS): Assembly, demographics and investigations *BMC Public Health* 2007; 7: 26-34
66. Ermers MJJ, Hoebee B, Hodemaekers HM, et al. IL-13 genetic polymorphism identifies children with late wheezing after respiratory syncytial virus infection. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1086- 1091.
67. Feleszko W, Zawadzka-Krajewska A, Matysiak K, et al. Parental tobacco smoking is associated with augmented IL-13 secretion in children with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(1): 97-102.
68. Fireman P. Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc* 2003; 24(2):79-83.
69. Flores P, Rebelo-de-Andrade H, Gonçalves P, et al. Bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus in an area of Portugal: epidemiology, clinical features and risk factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004 (23): 39-45.
70. Fonseca CB, Grisi S. Bronchiolitis, respiratory syncytial virus, and recurrent wheezing: what is the relationship? *Rev Hosp Clin Med S Paulo* 2003; 58 (1): 39-48.
71. Franco J, Costa C, Queiroz AM, et al. Estimativa da eficiência do uso de palivizumab na prevenção de hospitalizações por infecção por vírus sincicial respiratório numa coorte de prematuros. *Acta Pediatr Port* 2006; 37(1): 15-22.
72. Fredriksson P, Jaakkola N, Jaakkola JJ. Breastfeeding and childhood asthma: a six-year population-based cohort study. *BMC Pediatr*. 2007 Nov 28;7:39.
73. Friedlander SL, Jackson DJ, Gangnon RE, et al. Viral infections, cytokine dysregulation and the origins of childhood asthma and allergic diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24 (11 Suppl): S170-S176.
74. Friedman NJ, Zeiger RS. The role of breastfeeding in the development of allergies and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115 (6): 1238-1248.
75. Garcuño AC, García IP, Puertas JG, et al. Tabaco, lactancia y sibilantes en los tres primeros años. *An Pediatr (Barc)* 2003; 59 (6): 541-547.
76. Garofalo RP, Hintz KH, Hill V, et al. Production of interferon gamma in respiratory syncytial virus infection of humans is not associated with interleukins 12 and 18. *Journal of Medical Virology* 2004; 73: 289-294.
77. Garofalo RP, Hintz KH, Hill V, et al. A comparison of epidemiologic and immunologic features of bronchiolitis caused by influenza virus and respiratory syncytial virus. *Journal of Medical Virology* 2005; 75: 282-289.
78. Gern J, Brooks G, Meyer P, et al. Bidirectional interactions between viral respiratory illnesses and cytokine responses in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(1): 72-78.
79. Gern JE. Viral respiratory infection and the link to asthma. *Ped Infect Dis J* 2004; 23: S78-S86.
80. Gern JE, Reardon CL, Hoffjan S, et al. Effects of dog ownership and genotype on immune development and atopy in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:307-14.
81. Giugno KM, Machado DC, Amantéa SL, et al. Concentrações de interleucina-2 na secreção nasofaríngea de crianças com bronquiolite viral aguda pelo vírus respiratório sincicial. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80(4): 315-20.
82. Global Initiative for Asthma – Global strategy for asthma management and prevention - National Institutes of Health. www.ginasthma.com - 2006.
83. Goksör E, Gustafsson PM, Alm B, et al. Reduced airway function in early adulthood among subjects with wheezing disorder before two years of age. *Pediatr Pulmonol* 2008 Apr;43 (4):396-403.
84. Gold DR, Burge HA, Carey V, et al. Predictors of repeated wheeze in the first year of life: the relative roles of cockroach, birth weight, acute lower respiratory illness, and maternal smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(1): 227-36.
85. Graham LM. Preschool wheeze prognosis: how do we predict outcome? *Paediatric Respiratory Reviews* 2006; 7S: S115-S116.
86. Groner JA, Hoshaw-Woodard S, Koren G, et al. Screening for children's exposure to environmental tobacco smoke in a pediatric primary care setting. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2005; 159: 450-455.
87. Guerra S, Lohman C, Halonen M, et al. Reduced interferon γ production and soluble CD14 levels in early life predict recurrent wheezing by one year of age. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 70-76.

88. Guerrero PC, Lorenzo JMF, Bugos AMC, et al. Niveles de interleucinas en sangre de cordón: relación con antecedentes familiares de enfermedad alérgica. *Allerg et Immunopathol* 2005; 33(3): 131-137.
89. Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus – viral biology and the host response. *Journal of Infection* 2002; 45: 18-24.
90. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus *N Engl J Med* 2001; 334: 1917-1928.
91. Hayashi T, Gong X, Rosetto C, et al. Induction and inhibition of the Th2 phenotype spread: implications for childhood asthma. *J Immunol*. 2005; 174: 5864-5873.
92. Heaton T, Rowe J, Turner S, et al. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *The Lancet* 2005; 365: 142-149.
93. Henderson J, Hilliard TN, Sherriff A, et al. Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005; 16: 386-392.
94. Hoebbe B, Rietveld E, Bont L, et al. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis* 2003; 187: 2-11.
95. Hoffjan S, Nicolae D, Ostronaya I, et al. Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the 1st year of life. *Am. J. Hum Genet* 2005; 76: 696-704.
96. Holt PG, Sly PD. Interactions between respiratory tract infections and atopy in the aetiology of asthma. *Eur Respir J* 2002; 19: 538-545.
97. Horak E, Morass B, Ulmer H. Association between environmental tobacco smoke exposure and wheezing disorders in Austrian preschool children. *Swiss Med Wkly*. 2007; 137 (43-44): 608-613.
98. Illi S, von Mutius E, Lau S, et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001; 322: 390-395.
99. Inácio F. Genetics of asthma and allergy. *Rev Port Imunoalergologia* 2006; 14 (supl 2): 9-13.
100. Inquérito Nacional de Saúde 2005 / 2006. Continente. Dados gerais. Consumo de tabaco. Departamento de Estudos e Planeamento da Saúde (DEPS). Lisboa; 2007.
101. Janssen R, Bont L, Siezen CLE, et al. Genetic susceptibility to Respiratory Syncytial Virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis* 2007; 196(6): 826-34.
102. Janson C. The effect of passive smoking on respiratory health in children and adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8 (5): 510-516.
103. Jones HP, Hodge LM, Fujihashi K, et al. The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. *The Journal of Immunology*; 2001; 167: 4518-4526.
104. Joshi P, Shaw A, Kakakios A, et al. Interferon- γ levels in nasopharyngeal secretions of infants with respiratory syncytial virus and other respiratory virus infections. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 143-147.
105. Kazachkov MY, Hu PC, Carson JL, et al. Release of cytokines by human nasal epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *Exp Biol Med Vol*. 2002; 227 (5): 330-335.
106. Kelley CF, Mannino DM, Homa DM, et al. Asthma phenotypes, risk factors, and measures of severity in a national sample of US children. *Pediatrics* 2005; 115:726-731.
107. Kempf AM, Remington PL. New challenges for telephone survey research in the twenty-first century. *Annu Rev Public Health*. 2007; 28:113-26.
108. Kim CK, Kim SW, Park CS, et al. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 64-71.
109. Kimpen JLL. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and postbronchiolitis wheezing. *Respiratory Research* 2002; 3 (suppl 1): S40-S45.
110. Klinnert MD, Nelson HS, Price MR, et al. Onset and persistence of childhood asthma: predictors from infancy. *Pediatrics* 2001; 108 (4): e69-e77.
111. Koopman LP, Savelkoul H, van Bentem IJ, et al. Increased serum IL-10 / IL-12 ratio in wheezing infants. *Pediatric Allergy and Immunology* 2003; 14(2), 112-119.
112. Korppi M, Piippo-Savolainen E, Korhonen K. Respiratory morbidity 20 years after RSV infection in infancy. *Pediatric Pulmonology* 2004; 38: 155-160.
113. Krawiek ME, Westcott JY, Chu HW, et al. Persistent wheezing in very young children is associated with lower respiratory inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 (163): 1338-1343.
114. Kulig M, Luck W, Lau S, Niggemann B and the MAS-Group. Effect of pre- and postnatal tobacco smoke exposure on specific sensitization to food- and inhalant allergens during the first three years of life. *Allergy* 1999; 54: 220-228.
115. Kull I, Bohme M, Wahlgren CF, et al. Breast-feeding reduces the risk for childhood eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 657-661.
116. Laham FR, Israele V, Casellas JM, et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect Dis* 2004; 189: 2047-2056.
117. Landau LI. Paediatric basis of adult lung disease. *Pediatric Respiratory Reviews* 2006; 7S, S251-S254.

118. Lannerö E, Wickman M, Pershagen G, et al. Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life (BAMSE). *Respir Res* 2006; 7:3.
119. Lau S, Nickel R, Niggemann B, and the MAS-Group. The development of childhood asthma: lessons from the German Multicentre Allergy Study (MAS). *Paediatric Respiratory Reviews* 2002; 3:265-272.
120. Lau S, Nilsson M, Sulser C, et al. Use of Phadiatop Infant in diagnosis of specific sensitization in young children with wheeze or eczema. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008 Jun;19(4):337-41.
121. Lazzaro T, Hogg G, Barnett P. Respiratory syncytial virus infection and recurrent wheeze / asthma in children under five years: an epidemiological survey. *Journal of Pediatrics and Child Health* 2007; 43: 29-33.
122. Le Souef PN. Adverse effects of maternal smoking during pregnancy on innate immunity in infants. *Eur Respir J* 2006; 28: 675-677.
123. Lee KK, Hegele RG, Manfreda J, et al. Relationship of early childhood viral exposures to respiratory symptoms, onset of possible asthma and atopy in high risk children: the Canadian Asthma Primary Prevention Study. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42(3): 290-7.
124. Leech CS, Price JF, Holmes BJ, et al. Nonatopic wheezy children have reduced interferon- γ . *Allergy* 2000; 55: 74-78.
125. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, et al. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 633-639.
126. Leiria MJ, Sousa EN. A criança com pieira. In Palminha JM, Monteiro-Carrilho E (Eds), *Orientação Diagnóstica em Pediatria*. Lidel, Lisboa; 2003: 302-308.
127. Lemanske RF. Inflammation in childhood asthma and other wheezing disorders. *Pediatrics* 2002; 109: 368-372.
128. Lemanske Jr, RF, Busse WW. Asthma: Factors underlying inception, exacerbation, and disease progression. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: S456-S461.
129. Lewis DB, Gern JE, Hill HR et al. Newborn Immunology: Relevance to the Clinician. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2006; 36: 189-204.
130. Lindemans CA, Kimpfen JLL. The immune response to viral lower respiratory tract infections. In Pollard AJ, Finn A (Ed) *Hot topics and immunity in children II*. Springer Science + Business Media Inc 2005 New York, NY, Estados Unidos da América: 41-65.
131. Liu AH, Leung DYM. Renaissance of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1063-1066.
132. Loland L, Buchvald FF, Halkjaer LB, et al. Sensitivity of bronchial responsiveness measurements in young infants. *Chest* 2006; 129: 669-675.
133. Long SS, Pickering LK, Prober CG. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* 2002 Churchill Livingstone; 2nd Ed.
134. Lum S, Hulskamp G, Merkus P, et al. Lung function tests in neonates and infants with chronic lung disease: forced expiratory manoeuvres. *Pediatric Pulmonology* 2006; 41: 199-214.
135. Ly NP, Gold DR, Weiss ST, et al. Recurrent wheeze in early childhood and asthma among children at risk for atopy. *Pediatrics* 2006; 117: e1132-e1138.
136. Ly NP, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, et al. Cord blood cytokines and acute lower respiratory illnesses in the first year of life. *Pediatrics* 2007; 119: e171-e178.
137. Maclennan C, Hutchinson P, Holdsworth S, et al. Airway inflammation in asymptomatic children with episodic wheeze. *Pediatric Pulmonology*. 2006; 41: 577-583.
138. Mallol J, García-Marcos L. International study of wheezing in infants (EISL). www.respirar.org. 2007.
139. Mallol J, García-Marcos L, Aguirre V, et al. The International Study of Wheezing in Infants: Questionnaire validation. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 144: 44-50.
140. Mallol J, Andrade R, Auger F, et al. Wheezing during the first year of life in infants from low-income population: a descriptive study. *Allerg et Immunopathol* 2005; 33(3): 257-263.
141. Mallol J, Aguirre VL, Wandalsen G. Variability of the raised volume rapid thoracic compression technique in infants with recurrent wheezing. *Allerg et Immunopathol* 2005; 33(2): 74-79.
142. Mansbach JM, McAdam AJ, Clark S, et al. Prospective multicenter study of the viral etiology of bronchiolitis in the emergency department. *Acad Emerg Med*. 2008 Feb;15(2):111-8.
143. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995; 332:133-8.
144. Martinez FD. Heterogeneity of the association between lower respiratory illness in infancy and subsequent asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society* Vol 2; 2005: 157-161.
145. Martinez FD. What have we learned from the Tucson Children's Respiratory Study? *Paediatric Respiratory Reviews* 2002; 3: 193-197.
146. Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics* 2002 109 (2): 362-367.
147. Martins V, Guimarães MH, Machado MC, et al. *Nascer Prematuro em Portugal – Estudo Multicêntrico Nacional 1996-2000*. Bial, Lisboa 2002.

148. Matsumoto K, Shimanouchi Y, Kawakubo K, et al. Infantile eczema at one month of age is associated with cord blood eosinophilia and subsequent development of atopic dermatitis and wheezing until two years of age. *Arch Allergy Immunol* 2005; 137:69-76.
149. McNamara PS, Ritson P, Selby A, et al. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Arch Dis Child* 2003; 88: 922-926.
150. McNamara PS, Flanagan BF, Selby AM, et al. Pro- and anti-inflammatory responses in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J* 2004; 23: 106-112.
151. Meats-Dennis M. Bronchiolitis. *Arch Dis Child Edu Pract Ed* 2005; 90: ep81-ep86.
152. Mejías A, Chávez-Bueno S, Jafri HS, et al. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. *Pediatr Infect Dis J* 2005 (11 Suppl): S189-96, discussion S196-7.
153. Melendi GA, Laham FR, Monsalvo AC, et al. Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants. *Pediatrics* 2007; 120(2): e 410-415.
154. Mendes JP. Rinite e asma, mais diferenças do que semelhanças? Crítica a uma visão unitária. *Rev Port Imunoalergologia* 2004; 12: 129-139.
155. Midulla F, Tromba V, Lo Russo L, et al. Cytokines in the nasal washes of children with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Intern J Immunophol Pharmacol* 2006; 1: 231-235.
156. Mielck A, Reitmeir P, and Wjst M. Severity of childhood asthma by socioeconomic status. *International Journal of Epidemiology* 1996; 25: 388-393.
157. Mitchell EA, Stewart AW, on behalf of the ISAAC Phase One Study Group. The ecological relationship of tobacco smoking to the prevalence of symptoms of asthma and other atopic diseases in children: *Eur J Epidemiol* 2002; 17(7): 667-73.
158. Mobbs KJ, Smyth RL, O'Hea U, et al. Cytokines in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 2002; 33: 449-452.
159. Montero Vega MT. New aspects on inflammation in allergic diseases. *Allerg et Immunopathol* 2006; 34 (4): 156-170.
160. Morais-Almeida M, Gaspar A, Rosado-Pinto J. Epidemiology of asthma in Portugal, Cape Verde, and Macao. *Pediatr Pulmonology* 2001; Suppl 23: 35-37.
161. Morais-Almeida M, Marinho S, Gaspar A, et al. Reflexão sobre riscos, asma e tabagismo. *Rev Port Imunoalergologia* 2006; 14 (3): 219-236.
162. Morais-Almeida M, Gaspar A, Romeira AM, et al. Factores de risco para asma activa em idade escolar: estudo prospectivo com oito anos de duração. *Rev Port Imunoalergologia* 2004; 12: 20-40.
163. Morais-Almeida M, Gaspar A, Pires G, et al. Risk factors for asthma symptoms at school age: an 8-year prospective study. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28(2): 183-9.
164. Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS. Medical Microbiology; 5th Rev Edition 2005, Mosby Inc, St Louis Missouri, EUA.
165. Murray CS, Pipis SD, McArdle EC, et al. Lung function at one month of age as a risk factor for infant respiratory symptoms in a high risk population. *Thorax* 2002; 57: 388-392.
166. Nafstad P, Brunekreft B, Skrandal A, et al. Early respiratory infections, asthma, and allergy: 10 year follow up of the Oslo birth cohort. *Pediatrics*. 2005; 116; 2:e255-e262.
167. Neaville WA, Tisler C, Bhattacharya A, et al. Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 175-180.
168. Nielsen KG. Lung function and bronchial responsiveness in young children. Clinical and research applications. *Dan Med Bull* 2006; 53(1): 46-75.
169. Noakes PS, Holt PG, Prescott SL. Maternal smoking in pregnancy alters neonatal cytokine responses. *Allergy* 2003; 58: 1053-1058.
170. Norman GR, Streiner DL. Biostatistics The Bare Essentials 2nd Edition 2000 BC Decker Inc. Hamilton, London, Grã-Bretanha.
171. Nunes C, Ladeira S. Prevalência de doenças alérgicas em crianças e adolescentes – ISAAC na região do Algarve. *Rev Port Imunoalergologia* 2005; 13 (1): 47-67.
172. Oddy WH, de Klerk NH, Sly PD, et al. The effects of respiratory infections, atopy and breastfeeding on childhood asthma. *Eur Respir J* 2002; 19:899-905.
173. Obihara CC, Marals BJ, Gie RP, et al. The association of prolonged breastfeeding and allergic disease in poor urban children. *Eur J Respir J* 2005; 25: 970-977.
174. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. *Pediatric Respiratory Reviews* 2004 (Suppl A); S119-S126.
175. Oh JW, Lee HB, Park IK, et al. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-11, and interferon-gamma levels in nasopharyngeal aspirates from wheezing children with respiratory syncytial virus or influenza A virus infection. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002 (5): 350-6.
176. Oh JW. Respiratory viral infections and early asthma in childhood. *Allergy International* 2006; 55: 369-372.
177. Openshaw PJM, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clinical Microbiol Rev* 2005: 541-555.

178. Openshaw PJM, Hewitt C. Protective and harmful effects of viral infections in childhood on wheezing disorders and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: S40-S43.
179. Pacifico L. Chemokine concentrations in nasal washings of infants with rhinovirus illnesses. *CID* 2000; 31: 834-838.
180. Panickar JR, Grigg J. Controversies in the management of preschool viral wheeze. *Pediatric Respiratory Reviews* 2006; 7: 293-298.
181. Paricio-Talayero JM, Lizán-García M, Puime AO, et al. Full breastfeeding and hospitalization as a result of infections in the first year of life. *Pediatrics* 2006; 118: e92-e99.
182. Pattenden S, Antova T, Neuberger M, et al. Parental smoking and children's respiratory health: independent effects of prenatal and postnatal exposure. *Tob Control* 2006 (4): 294-301.
183. Pawliska-Chmara R, Wronka I. Assessment of the effect of socioeconomic factors on the prevalence of respiratory disorders in children. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007; 58(Suppl 5): 523-529.
184. PE Biosystems Bulletin. DNA/RNA Real-time Quantitative PCR, pp 1-8. 2006
185. Perrotta C, Ortiz Z, Roque M. Chest physiotherapy for acute bronchiolitis in paediatric patients between 0 and 24 months old. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 Jan 24(1):CD004873.
186. Phaybouth V, Wang SZ, Hutt JA, et al. Cigarette smoke suppresses Th1 cytokine production and increases RSV expression in neonatal model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L222-L231.
187. Pickering LK, Baker CJ, McMillan J, Long S (Eds). American Academy of Pediatrics. Red Book Report of the Committee on Infectious Diseases 27th Ed. 2006 Elk Grove Village, IL, EUA.
188. Piedimonte G, Simoes EA. Respiratory syncytial virus and subsequent asthma: one step closer to unravelling the Gordian knot? *Eur Respir J* 2002; 20: 515-517.
189. Piippo-Savolainen E, Korppi M. Wheezy babies-wheezy adults? Review on long-term outcome until adulthood after early childhood wheezing. *Acta Paediatr* 2008; 97(1):5-11.
190. Pinto RA, Arredondo SM, Bono MR, et al. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics* 2006; 117: e878-e886.
191. Pitrez PM, Brennan S, Sly PD. Inflammatory profile in nasal secretions of infants hospitalized with acute lower airway tract infections. *Respirology* 2005 (3): 365-70.
192. Pitrez PM, Ponzi D, Machado DC, et al. Discrepancy between cytokine production from peripheral blood mononuclear cells and nasal secretions among infants with acute bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004; 92(6):659-662.
193. Pitrez PMC, Machado DC, Jones MH, et al. Th-1 and Th-2 cytokine production in infants with virus-associated wheezing. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(1): 51-54.
194. Prescott S: The development of respiratory inflammation in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 2006; 7:89-96.
195. Prescott SL. Effects of early cigarette smoke exposure on early immune development and respiratory disease. *Paediatr Respir Rev.* 2008 Mar; 9(1):3-9.
196. Psarras S, Papadopoulos NG, Johnston SL. Pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis-related wheezing. *Pediatric Respiratory Reviews* 2004 (Suppl A); S179-S184.
197. Puthothu B, Krueger M, Forster J. Association between severe respiratory syncytial virus infection and IL13 / IL4 haplotypes. *J Infect Dis.* 2006; 193(3): 438-441.
198. Ramsey CD, Gold DR, Litonjus A, et al. Respiratory illnesses in early life and asthma and atopy in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 150-156.
199. Rebordão M, Delgado L, Pinto H, et al. Citocinas T1 e T2 na doença atópica: avaliação do contributo relativo de diferentes subpopulações celulares T periféricas. *Rev Port Imunoalergologia* 2005; 13 (2): 141-152.
200. Rebordão M, Delgado L, Pinto H, et al. Repercussão da imunoterapia específica na população T1 e T2 de linfócitos periféricos em doentes atópicos. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 2006; Vol XII (2): 107-130.
201. Reed CE. The natural history of asthma. *J Allergy Clin Immunology* 2006; 118:543-548.
202. Reya CC, García-García ML, Albañil-Ballesteros MR. Bronquiólitis y obstrucción bronquial recurrente: ¿es la eosinofilia un factor de riesgo? *Anales Españoles de Pediatría* 2001; 55 (6): 511-516.
203. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 2004; 112: 352-363.
204. Rosado-Pinto J, Morais-Almeida M (Ed). A Criança Asmática no Mundo da Alergia. Euromédica Edições Médicas. Lisboa, 2003.
205. Rumold R, Jyrälä M, Diaz-Sanchez D. Secondhand smoke induces allergic sensitization in mice. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 4765-4770.
206. Sadeghnejad A, Karmaus W, Arshad SH, et al. IL13 gene polymorphisms modify the effect of exposure to tobacco smoke on persistent wheeze and asthma in childhood, a longitudinal study. *Respir Res.* 2008 Jan 10; 9:2.
207. Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:969-977.

208. Schauer U, Hoffjan S, Rothoef T, et al. Severe respiratory syncytial virus infections and reduced interferon- γ generation in vitro. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 102-109.
209. Sengler C, Lau S, Wahn U, et al. Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments. *Respir Res* 2002; 3: 7-21.
210. Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, et al. Increased interleukin-4 and decreased interferon- γ in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1290-1293.
211. Sherriff A, Peters TJ, Henderson J, et al. Risk factor associations with wheezing patterns in children followed longitudinally from birth to 3½ years. *International Journal of Epidemiology* 2001; 30: 1474-1484.
212. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, et al. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Care Med* 2000; 161 (5): 1501-1507.
213. Silkoff PE, Erzurum SC, Lundberg JO, et al and the American Thoracic Society; HOC Subcommittee of the Assembly on Allergy, Immunology, and Inflammation. ATS workshop proceedings: exhaled nitric oxide and nitric oxide oxidative metabolism in exhaled breath condensate. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 131-145.
214. Silva MJ, Ferraz C, Pissarra S, et al. Role of vírus and atypical bacteria in asthma exacerbations among children in Oporto (Portugal). *Allerg et Immunopathol* 2007; 35(1): 4-9.
215. Silverman M (Ed) Childhood asthma and other wheezing disorders. 1st Ed, Chapman Hall, London. 2001.
216. Silvestri M, Sabatini F, Defillipi, AC, et al. The wheezy infant – immunological and molecular considerations. *Pediatric Respiratory Reviews* 2004; 5 (Suppl A): S81-S87.
217. Singh AM, Moore PE, Gern JE, et al. Bronchiolitis to asthma: a review and call for studies of gene–virus interactions in asthma causation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 108-119.
218. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatments in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352: 2163-2173.
219. Smith AM, Bernstein DI, LeMasters GK, et al. Environmental tobacco smoke and interleukin 4 polymorphism (C-589T) gene: environment interaction increases risk of wheezing in African-American infants. *J Pediatr*. 2008 May;152(5):709-15, 715.
220. Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *The Lancet* 2006; 22; 368(9532): 312-322.
221. Smyth RL, Mobbs KJ, O’Hea U, et al. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype. *Pediatric Pulmonology* 2002; 33: 339-346.
222. Spann KM, Tran KC, Chi B, et al. Suppression of the induction of alpha, beta, and gamma interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *J Virol* 2004; 78: 4363-4369.
223. Stensballe LG, Kristensen K, Simoes EAF, et al. Atopic disposition, wheezing, and subsequent respiratory syncytial virus hospitalization in Danish children younger than 18 months: a nested case-control study. *Pediatrics* 2006; 118: e1360-e1368.
224. Stern DA, Guerra S, Halonen M, et al. Low IFN-gamma production in the first year of life as a predictor of wheeze during childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120 (4):835-41.
225. Stick S. Paediatric origins of adult lung disease 1: The contribution of airway development to paediatric and adult lung disease. *Thorax* 2000; 55: 587-594.
226. Stokes-Peebles Jr R, Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus in the murine model. *Proceedings of the American Thoracic Society* Vol 2; 2005: 110-125.
227. Stokes-Peebles Jr R. Viral infections, atopy, and asthma: is there a casual relationship? *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: S15-S18.
228. Stokes-Peebles Jr R, Sheller JR, Collins RD. Respiratory syncytial virus infection does not increase allergen-induced type 2 cytokine production, yet increases airway hyperresponsiveness in mice. *Journal of Medical Virology* 2001; 63: 178-188.
229. Sutton TC, Tayyari F, Aatif-Khan M, et al. T helper background protects against airway hyperresponsiveness and inflammation in guinea pigs with persistent respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res* 2007; 61: 525-529.
230. Swartz MH (Ed). Textbook of Physical Diagnosis: History and Examination. 3rd Edition 1998 WB Saunders, Philadelphia Pennsylvania, EUA.
231. Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, et al. Tucson children’s respiratory study: 1980 to present. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 661-675.
232. Taussig LM, Landau LI (Ed). Pediatric Respiratory Medicine 2nd Edition 2008. Mosby Year Book Inc, St Louis Missouri, EUA.
233. Teixeira LK, Fonseca BPF, Barboza BA, et al. The role of interferon- γ on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 (Suppl 1): 137-144.
234. Till SJ, Jopling LA, Wachholz PA, et al. T cell phenotypes of the normal nasal mucosa: induction of Th2 cytokines and CCR3 expression by IL-4. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 2303-2310.
235. Tripp RA, Moore D, Barskey IV A, et al. Peripheral blood mononuclear cells from infants hospitalized because of respiratory syncytial virus infection express T Helper–1 and T Helper–2 cytokines and CC chemokine messenger RNA. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185: 1388-1394.

236. Tripp RA, Oshansky C, Alvarez R. Cytokines and respiratory syncytial virus infection. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 147-149.
237. Truyen E, Coteur L, Dilisen E, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax* 2006; 61(3): 202-8.
238. Uekert SJ, Akan G, Evans MD, et al. Sex related differences in immune development and the expression of atopy in early childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1375-1381.
239. van Bente IJ, van Drunen I, Koevoet JLM. Reduced nasal IL-10 and enhanced TNF- α responses during Rhinovirus and RSV-induced upper respiratory tract infection in atopic and non-atopic infants. *J Med Virol* 2005; 75: 348-357.
240. van Woensel JB, van Aalderen WM, Kimpen JL. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. *BMJ* 2003; 327: 97-103.
241. Vercelli D. Mechanisms of the hygiene hypothesis – molecular and otherwise. *Current Opinion in Immunology* 2006; 18: 733-737.
242. Videira PA, Borrego LM, Trindade H. Os factores genéticos da asma. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 2006; 12(6): 683-708.
243. Voets S, van Berlaer G, Hachimi-Idrissi S. Clinical predictors of the severity of bronchiolitis. *Eur J Emerg Med* 2006 (3):134-8.
244. Wang EE, Milner RA, Navas L, et al. Observer agreement for respiratory signs and oxymetry in infants hospitalized with lower respiratory infections. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 106-109.
245. Waser M, von Mutius E, Riedler J, et al. Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children. *Allergy*. 2005; 60: 177-184.
246. Weinberg GA. Parainfluenza viruses: an underappreciated cause of pediatric respiratory morbidity. *Pediatr Infect Dis J* 2006 (5): 447-8.
247. Wills-Karp M, Brandt D, Morrow AL. Understanding the origin of asthma and its relationship to breastfeeding. *Adv. Exp. Med. Biol* 2004; 554: 171-91.
248. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004; 350: 443-450.
249. Wright AL. The epidemiology of the atopic child: who is at risk for what? *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: S2-S7.
250. You D, Becnel D, Wang K, et al. Exposure of neonates to respiratory syncytial virus is critical in determining subsequent airway response in adults. *Respiratory Research* 2006; 7: 107-117.
251. Young B, Lowe JS, Stevens A, et al. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 2006 Churchill Livingstone; 5th Rev Edition, New York, NY, EUA.
252. Zeldin DC, Eggleston P, Chapman M, et al. How exposures to biologic agents influence the induction and incidence of asthma. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114: 620-626.

ANEXO 1

Questionário à entrada

FACTORES PREDITIVOS NA BRONQUIOLITE – INQUÉRITO Nº

PROCESSO Nº	DATA
NOME	
	SEXO M ☐ F ☐ RAÇA B ☐ N ☐
DATA DE NASC	IDADE meses

IDADE DA MÃE anos	IDADE DO PAI anos
ESCOLARIDADE DA MÃE anos	ESCOLARIDADE DO PAI anos
CO-HABITANTES	IRMÃOS
ATOPIA PAI S ☐ N ☐	ATOPIA MÃE S ☐ N ☐
ANIMAIS Casa ☐ Infantário ☐	AQUECIMENTO Lareira ☐ Óleo ☐ Outro

PESO AO NASCER g	ID GEST sem	TABAGISMO MATERNO S ☐ N ☐
INFANTÁRIO S ☐ N ☐	ECZEMA S ☐ N ☐	LEITE MATERNO S ☐ N ☐

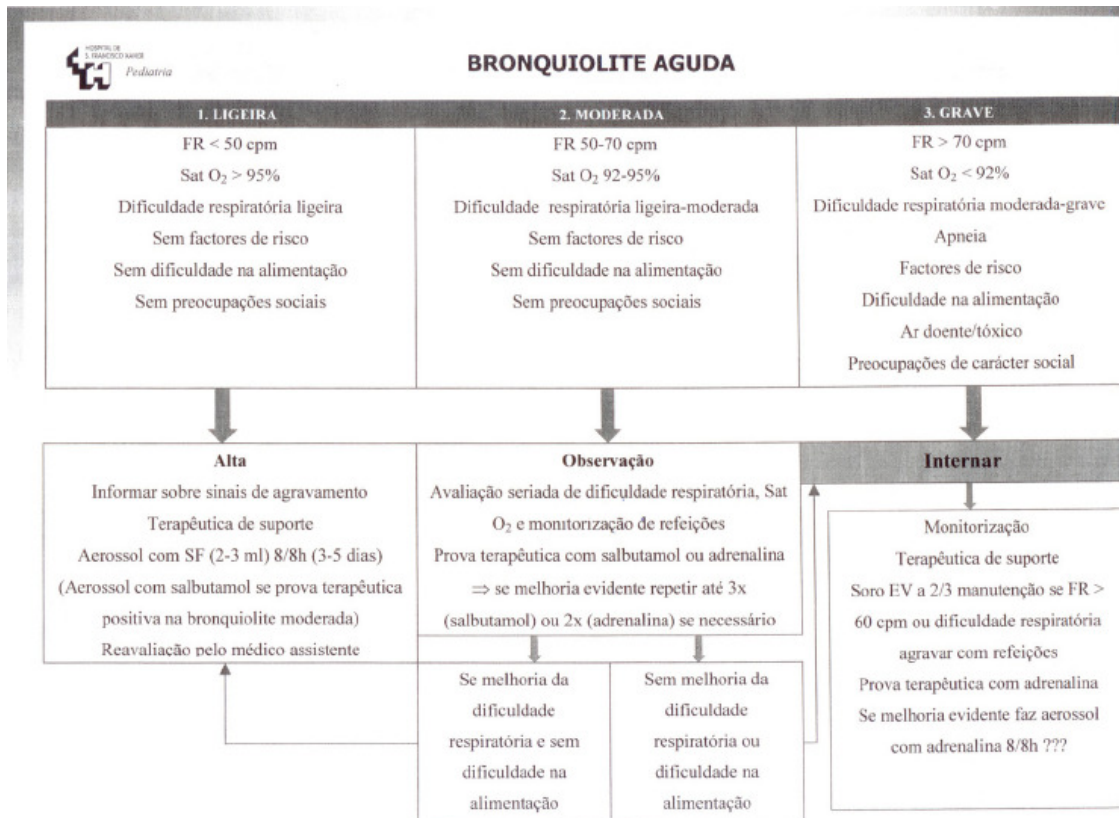
PESO ACTUAL g	FEBRE S ☐ N ☐	INFECÇÃO RESPIRATÓRIA S ☐ N ☐
FREQ RESP cpm	SIBILOS: Insp ☐ Exp ☐ Dois tempos ☐ Silêncio ☐	SAT _{O₂} %
SCORE DE GRAVIDADE	INTERNAMENTO S ☐ N ☐	

RADIOGRAFIA TORAX PA	
Condensação ☐	Padrão intersticial ☐ Atelectasia ☐ Hiperinsuflação ☐ Outro ☐
PESQUISA DE VÍRUS Neg ☐ RSV ☐ Adeno ☐ Influenza ☐ Parainfluenza ☐ Outro	
LEUCÓCITOS cels/ μ l N % L % E %	

ANEXO 2

Protocolo de tratamento da bronquiolite aguda (Serviço de pediatria do HSFX)

HOSPITAL DE S. FRANCISCO XAVIER Pediatría		BRONQUIOLITE AGUDA	
1. DIAGNÓSTICO Idade < 2 anos, 1º ou 2º episódio de dificuldade respiratória Início súbito de sintomas respiratórios Infecção respiratória alta • Febre, coriza Infecção respiratória baixa • Tosse, pieira		4. TERAPÉUTICA De suporte: • Oxigénio para manter Sat O₂ > 95% (em internamento) • Hidratação • Aspiração de secreções • Cabeceira elevada • Refeições fracionadas Broncodilatadores: • Aerossol com adrenalina (0,5 ml/kg - max. 5ml) com 2-3 ml de SF • Aerossol com salbutamol (0,03 ml/kg/dose - máx. 1ml) com 2-3 ml de SF	
2. EXAME OBJECTIVO Frequência Respiratória Frequência Cardíaca Sinais de Dificuldade Respiratória • Tiragem, adejo nasal Auscultação Pulmonar • Fervores, sibilos, roncos, ↑ TE Grau de hidratação Temperatura Complicações – OMA, pneumonia		5. INDICAÇÕES PARA INTERNAMENTO Sat O ₂ < 92% em ar ambiente Frequência respiratória > 70 ciclos/min Dificuldade respiratória moderada-grave Apneia Dificuldade na alimentação Factores de risco – pré-termo, idade < 3 meses, doença cardíaca congénita, doença respiratória crónica, imunodeficiência Preocupações de carácter social	
3. EXAMES COMPLEMENTARES DE DIAGNÓSTICO Saturação transcutânea de O ₂ Radiografia de tórax se: • Não há melhoria clínica • Doença grave • Suspeita de outro diagnóstico Hemograma e PCR se: • Suspeita de infecção bacteriana Pesquisa de vírus nas secreções – no doente a internar		Bibliografia ■ American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Clinical Practice Guideline. Pediatrics 2006;118(4):1774-93 ■ Coffin, Susan. Bronchiolitis: In-Patient Focus. Pediatr Clin N Am 52 (2005) 1047-1057 ■ Meates-Dennis, Maud. Prática Clínica – Bronquiolite. Actualidade em Pediatria 2006, XIV, 5-13 Autores: Dra. Rita Monteiro, Dr. Pedro Flores Novembro 2006	



Anexo 3:**Questionário de seguimento em consulta dos doentes com sibilância recorrente.
Em simultâneo, foi feita a exclusão de outras causas de sibilância recorrente.**

Nos doentes avaliados telefonicamente, o exame objectivo foi omitido e as outras causas foram excluídas conforme informação fornecida aos pais pelos médicos assistentes

Anamnese

1. Episódios de tosse, pieira, “gatinhos”
2. Exacerbações de dificuldade respiratória
3. Respiração ruidosa, tosse emetizante
4. Dificuldades na alimentação associada aos sintomas respiratórios
5. Relato de tiragem ou adejo nasal
6. Aumento da frequência respiratória
7. Necessidade de terapêutica com broncodilatadores
8. Desencadeantes específicos (contacto com tabaco, animais, humidade, fungos, ar frio, infecções respiratórias, riso)
9. Perturbação do ritmo do sono pelos sintomas respiratórios (tosse nocturna, despertares, episódios de apneia)
10. Sintomas nasais (obstrução nasal, rinorreia, prurido, esternutos)

Exame objectivo

1. Eczema atópico ou pele xerótica
2. Conjuntivite alérgica
3. Obstrução nasal persistente, saudação alérgica
4. Sinais de dificuldade respiratória
5. Temp expiratório prolongado, roncos, sibilos

Anexo 4: Consentimento informado e informação complementar fornecida aos pais no momento do recrutamento para o estudo

CONSENTIMENTO INFORMADO

O seu bebé tem, neste momento, uma bronquiolite aguda.

Esta doença, caracterizada por tosse, pieira e falta de ar é, muitas vezes, uma episódio isolado provocado por um vírus. No entanto, alguns bebés voltam a ter episódios semelhantes nos meses seguintes, com necessidade de cuidados médicos frequentes.

Com o objectivo de avaliar alguns factores de risco desta doença, nomeadamente para tentar compreender porque é que algumas crianças têm crises frequentes de falta de ar e outras não, elaborámos um estudo no qual gostaríamos de incluir todos os bebés com bronquiolite aguda que são atendidos neste serviço de urgência.

Tentámos que o incómodo para as crianças e famílias fosse mínimo. No entanto, solicitamos a vossa colaboração para:

- Responder a um curto inquérito
- Colher um pouco de sangue para análises
- Colher uma zaragatoa nasal para análises
- Seguir a criança em consulta de Pneumologia Infantil até aos terceiro aniversário (aproximadamente uma consulta de 3 em 3 meses)

A sua colaboração, que muito agradecemos, é fundamental para a realização deste estudo, que poderá ter benefícios para o seu filho e nos ajudar a compreender a evolução destas doenças.

Para qualquer esclarecimento, contactar o investigador principal Dr Pedro Flores (Pediatra) através dos nºs 938 284 232 ou 213 000 424.

Fui informado(a) e concordo com a colaboração na realização do estudo “Indicadores preditivos do risco de sibilância recorrente após uma bronquiolite”

Lisboa __/__/____

O progenitor ou tutor da criança

Nome _____ Rubrica _____

Anexo 5: Parecer da Comissão de Ética do HSFX



HSFX, 28 de Setembro de 2004

De: **Comissão de Ética**

Para: **Dr. Pedro Flores**

Assunto: Trabalho prospectivo "Indicadores preditivos do risco de sibilância recorrente após uma bronquiolite"

Informo V.Exa. que a Comissão Ética em reunião no dia 27/09/04, aprovou a realização do trabalho acima referido, no âmbito da sua tese de doutoramento.

Com os melhores cumprimentos,

O Presidente da Comissão de Ética


Dr. Carlos Neves

ANEXO 6: Avaliação, por análise univariada, da relação entre os diversos parâmetros e a evolução para sibilância recorrente

PARÂMETRO AVALIADO	SIBILANTE	NÃO SIBILANTE	p
Semana do 1º episódio (mean rank)	73,4	79,6	0,379
Idade (dias) Média ± desvio-padrão	151 ± 105	250 ± 166	<0,001
Sexo % (M)	60,5	59,2	0,869
Raça % (Branca)	86,8	84,2	0,645
Escolaridade da mãe (mediana)	12	12	0,709
Escolaridade do pai (mediana)	10	11	0,816
Nº de coabitantes (mean rank)	85,0	68,0	0,082
Idade da mãe	28,9 ± 5,6	28,5 ± 6,1	0,823
Irmãos (mediana)	1	1	0,359
Tabagismo passivo % Sim	67,1	50,0	0,032
Atopia na mãe % Sim	40,5	24,3	0,035
Atopia no pai % Sim	23,3	24,7	0,568
Atopia nos irmãos % Sim	27,1	26,6	0,979
Atopia num familiar % Sim	57,9	48,7	0,255
Idade gestacional Média ± desvio-padrão	38,0 ± 2,4	38,5 ± 1,8	0,492
Peso ao nascer (g) Média ± desvio-padrão	3082 ± 619	3202 ± 515	0,196
Exposição de tabaco antenatal % Sim	36,5	18,9	0,017
Aleitamento materno % Sim	65,8	59,2	0,402
Infantário % Sim	58,5	50,0	0,398
Exposição a outras crianças % Sim	42,1	55,3	0,105
Animais % Sim	27,6	23,7	0,577
Aquecimento % Sim	23,7	21,1	0,697
Eczema % Sim	14,5	17,1	0,656
Peso Actual (g) Média ± desvio-padrão	6579 ± 2328	7837 ± 2402	0,001
Febre % Sim	25,0	51,3	0,001
Índice de gravidade (Média ± desvio-padrão)	8,7 ± 4,0	6,7 ± 3,5	0,001
Internamento % Sim	48,7	32,9	0,048
Radiografia do tórax (hiperinsuf: interst: condens / atelectasia)	40,6:42,2:17,2	39,1:47,8:13,0	0,729
Vírus respiratórios % positivos	78,3	51,4	0,001
VSR % positivos	69,6	35,1	<0,001
Leucócitos (mean rank)	29,7	34,1	0,355
Neutrófilos	28,5	35,9	0,116
Linfócitos	33,2	29,0	0,374
Eosinófilos	33,8	28,1	0,216
Interleucina 4 média ± desvio-padrão	27,137 ± 3,596	26,506 ± 4,849	0,500
Interleucina 13 média ± desvio-padrão	23,451 ± 3,597	23,601 ± 3,434	0,830
Interleucina 12 média ± desvio-padrão	19,406 ± 4,159	20,181 ± 3,223	0,259
Interferão γ média ± desvio-padrão	20,559 ± 4,919	20,753 ± 3,416	0,806

ANEXO 7: Avaliação, por análise univariada, do comportamento de IL-4.

PARÂMETRO AVALIADO	Sim	Não	p
Idade (coef de correlação)	0,034		0,761
Sexo M (Média $\pm$ Desvio-padrão)	26,893 $\pm$ 4,303	26,582 $\pm$ 4,502	0,754
Raça branca	26,805 $\pm$ 4,334	26,497 $\pm$ 4,774	0,835
Escolaridade da mãe	0,028		0,804
Escolaridade do pai	0,062		0,583
Nº de coabitantes (R ²)	0,000		0,327
Idade da mãe	0,023		0,834
Irmãos (R ²)	-0,015		0,568
Tabagismo passivo	26,234 $\pm$ 4,820	27,449 $\pm$ 3,642	0,198
Atopia na mãe	27,053 $\pm$ 4,326	26,635 $\pm$ 4,408	0,689
Atopia no pai	26,338 $\pm$ 4,496	26,972 $\pm$ 4,372	0,573
Atopia nos irmãos	25,573 $\pm$ 3,463	27,599 $\pm$ 3,612	0,110
Atopia num familiar	26,644 $\pm$ 4,182	26,917 $\pm$ 4,621	0,780
Idade gestacional (coef de correlação)	-0,201		0,058
Peso ao nascer (coef de correlação)	-0,184		0,099
Exposição de tabaco antenatal	25,691 $\pm$ 4,842	27,213 $\pm$ 4,106	0,151
Aleitamento materno	27,177 $\pm$ 4,249	25,885 $\pm$ 4,548	0,214
Infantário	27,340 $\pm$ 3,548	26,447 $\pm$ 5,460	0,462
Exposição a outras crianças	27,130 $\pm$ 3,329	26,848 $\pm$ 5,040	0,509
Animais	26,575 $\pm$ 5,053	26,830 $\pm$ 4,155	0,822
Aquecimento	26,523 $\pm$ 4,912	26,810 $\pm$ 4,296	0,835
Eczema	26,500 $\pm$ 5,078	26,813 $\pm$ 4,264	0,820
Peso Actual (coef de correlação)	-0,008		0,945
Febre	26,511 $\pm$ 4,294	26,959 $\pm$ 4,444	0,647
Índice de gravidade (coef de correlação)	-0,116		0,301
Internamento	26,476 $\pm$ 4,462	26,974 $\pm$ 4,321	0,614
Radiografia do tórax (hiperins: inters: cond / atel)	27,4 $\pm$ 3,3: 26,6 $\pm$ 4,7: 25,3 $\pm$ 5,1		0,315
Vírus respiratórios	27,695 $\pm$ 3,476	24,238 $\pm$ 5,496	0,001
Leucócitos	0,005		0,977
Neutrófilos	0,185		0,295
Linfócitos	-0,314		0,070
Eosinófilos	0,004		0,984
Índice preditivo de asma	27,443 $\pm$ 3,123	26,865 $\pm$ 4,040	0,642

ANEXO 8: Avaliação, por análise univariada, do comportamento de IL-13.

PARÂMETRO AVALIADO	Sim	Não	p
Idade (coef de correlação)	0,084		0,394
Sexo M (Média ± Desvio-padrão)	23,505 ± 3,741	23,578 ± 3,143	0,917
Raça % (Branca : Outra)	23,497 ± 3,514	23,853 ± 3,428	0,751
Escolaridade da mãe	0,125		0,207
Escolaridade do pai	0,037		0,714
Nº de coabitantes (R ²)	0,022		0,073
Idade da mãe	0,092		0,354
Irmãos (R ²)	-0,009		0,772
Tabagismo passivo	23,461 ± 3,609	23,636 ± 3,361	0,802
Atopia na mãe	24,141 ± 3,100	23,240 ± 3,650	0,218
Atopia no pai	23,687 ± 3,347	23,506 ± 3,559	0,814
Atopia nos irmãos	22,659 ± 2,973	24,084 ± 3,256	0,161
Atopia num familiar	23,752 ± 3,127	23,261 ± 3,919	0,479
Idade gestacional (coef de correlação)	-0,112		0,258
Peso ao nascer (coef de correlação)	-0,151		0,126
Exposição de tabaco antenatal	23,267 ± 3,585	23,629 ± 3,475	0,645
Aleitamento materno	24,017 ± 3,799	22,731 ± 2,766	0,049
Infantário	23,429 ± 2,653	24,009 ± 4,044	0,470
Exposição a outras crianças	23,408 ± 2,864	23,468 ± 3,989	0,729
Animais	23,708 ± 3,654	23,477 ± 3,457	0,772
Aquecimento	22,503 ± 3,250	23,781 ± 3,519	0,142
Eczema	24,136 ± 3,757	26,813 ± 3,451	0,456
Peso actual (coef de correlação)	0,043		0,665
Febre	23,502 ± 3,633	23,558 ± 3,417	0,936
Índice de gravidade (coef de correlação)	-0,019		0,849
Internamento	23,679 ± 3,268	23,438 ± 3,656	0,731
Radiografia do tórax (hiperins: inters: cond / atel)	23,4 ± 3,2 : 23,5 ± 3,8 : 23,9 ± 3,7		0,925
Vírus respiratórios	23,692 ± 3,615	23,182 ± 2,220	0,494
Leucócitos	-0,223		0,156
Neutrófilos	0,170		0,281
Linfócitos	-0,452		0,003
Eosinófilos	-0,320		0,039
Índice preditivo de asma	23,026 ± 3,494	23,841 ± 3,719	0,448

ANEXO 9: Avaliação, por análise univariada, do comportamento de IL-12.

PARÂMETRO AVALIADO	Sim	Não	p
Idade (coef de correlação)	0,116		0,208
Sexo M (Média ± Desvio-padrão)	19,789 ± 3,734	19,833 ± 3,713	0,949
Raça % (Branca : Outra)	19,893 ± 3,420	19,313 ± 5,150	0,543
Escolaridade da mãe (R²)	0,192		0,038
Escolaridade do pai	0,026		0,784
Nº de coabitantes (R ²)	0,016		0,087
Idade da mãe	0,082		0,373
Irmãos (R ²)	-0,007		0,726
Tabagismo passivo	20,630 ± 3,659	18,729 ± 3,526	0,005
Atopia na mãe	19,908 ± 3,703	19,812 ± 3,729	0,896
Atopia no pai	19,689 ± 3,360	19,980 ± 3,783	0,703
Atopia nos irmãos	19,677 ± 3,480	19,980 ± 4,082	0,784
Atopia num familiar	19,919 ± 3,503	19,674 ± 3,969	0,720
Idade gestacional (coef de correlação)	0,079		0,391
Peso ao nascer (coef de correlação)	-0,013		0,889
Exposição de tabaco antenatal	20,136 ± 3,795	19,691 ± 3,694	0,763
Aleitamento materno	20,070 ± 3,853	19,367 ± 3,455	0,317
Infantário	18,891 ± 2,831	21,107 ± 3,711	0,003
Exposição a outras crianças	19,252 ± 3,549	20,308 ± 3,808	0,120
Animais	20,641 ± 3,304	19,552 ± 3,805	0,175
Aquecimento	19,103 ± 3,691	19,991 ± 3,712	0,289
Eczema	19,183 ± 4,371	19,909 ± 3,603	0,457
Peso Actual (coef de correlação)	0,074		0,423
Febre	19,850 ± 3,661	19,776 ± 3,769	0,915
Índice de gravidade (coef de correlação)	0,031		0,735
Internamento	20,011 ± 3,505	19,665 ± 3,863	0,618
Radiografia do tórax (hiperins: inters: cond / atel)	19,9 ± 3,1 : 19,9 ± 4,3 : 20,3 ± 3,6		0,936
Vírus respiratórios	19,831 ± 3,514	19,970 ± 4,071	0,851
Leucócitos	-0,367		0,009
Neutrófilos	0,108		0,459
Linfócitos	-0,427		0,002
Eosinófilos	-0,100		0,493
Índice preditivo de asma	18,775 ± 3,779	19,995 ± 4,452	0,265

ANEXO 10: Avaliação, por análise univariada, do comportamento de IFN- γ .

PARÂMETRO AVALIADO	Sim	Não	p
Idade (coef de correlação)	-0,104		0,259
Sexo M (Média $\pm$ Desvio-padrão)	20,863 $\pm$ 4,155	20,379 $\pm$ 4,195	0,535
Raça % (Branca : Outra)	20,567 $\pm$ 4,056	21,204 $\pm$ 4,787	0,552
Escolaridade da mãe	0,129		0,166
Escolaridade do pai	0,006		0,949
Nº de coabitantes (R ²)	0,005		0,213
Idade da mãe	0,160		0,082
Irmãos (R ²)	-0,008		0,839
Tabagismo passivo	21,646 $\pm$ 4,315	19,351 $\pm$ 3,583	0,003
Atopia na mãe	20,228 $\pm$ 4,018	20,899 $\pm$ 4,235	0,414
Atopia no pai	20,391 $\pm$ 3,578	20,858 $\pm$ 4,254	0,587
Atopia nos irmãos	19,685 $\pm$ 4,603	21,195 $\pm$ 4,288	0,228
Atopia num familiar	20,299 $\pm$ 3,798	19,674 $\pm$ 3,969	0,304
Idade gestacional (coef de correlação)	0,110		0,235
Peso ao nascer (coef de correlação)	-0,136		0,141
Exposição de tabaco antenatal	20,543 $\pm$ 4,818	20,746 $\pm$ 3,947	0,818
Aleitamento materno	20,901 $\pm$ 4,443	20,273 $\pm$ 3,665	0,406
Infantário	19,341 $\pm$ 3,256	21,095 $\pm$ 4,371	0,042
Exposição a outras crianças	19,475 $\pm$ 3,801	21,755 $\pm$ 4,206	0,002
Animais	21,308 $\pm$ 3,635	20,465 $\pm$ 4,309	0,310
Aquecimento	20,651 $\pm$ 3,793	20,667 $\pm$ 4,268	0,986
Eczema	20,170 $\pm$ 3,834	20,751 $\pm$ 4,228	0,565
Peso Actual (coef de correlação)	-0,133		0,149
Febre	20,901 $\pm$ 4,222	20,503 $\pm$ 4,141	0,610
Índice de gravidade (coef de correlação)	0,038		0,680
Internamento	21,651 $\pm$ 4,074	19,996 $\pm$ 4,113	0,033
Radiografia do tórax (hiperins: inters: cond / atel)	21,3 $\pm$ 4,0 : 20,5 $\pm$ 4,3 : 20,6 $\pm$ 4,2		0,565
Vírus respiratórios	20,847 $\pm$ 4,357	20,581 $\pm$ 3,553	0,749
Leucócitos	-0,326		0,064
Neutrófilos	-0,117		0,429
Linfócitos	-0,295		0,052
Eosinófilos	-0,155		0,294
Índice preditivo de asma	19,543 $\pm$ 3,957	21,405 $\pm$ 5,520	0,152