

Crianças com Sibilância Recorrente

Estudo de Função Respiratória,
Avaliação Imunológica e Polimorfismos Genéticos

LUÍS MIGUEL NABAIS BORREGO



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LISBOA
2008

**DISSERTAÇÃO PARA CANDIDATURA
AO GRAU DE DOUTOR EM MEDICINA
NA ESPECIALIDADE DE IMUNOLOGIA**

ORIENTADOR

PROFESSOR DOUTOR JOAQUIM ANTÓNIO MACHADO CAETANO
Departamento de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

CO-ORIENTADOR

PROFESSOR DOUTOR HELDER TRINDADE
Departamento de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

AGRADECIMENTOS

No Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCMUNL), onde tenho o prazer e a honra de trabalhar, agradeço: ao Professor Doutor Joaquim António Machado Caetano, meu Orientador, pelo seu incentivo e apoio constantes. Ao Prof. Doutor Hélder Trindade, actual Director, meu co-Orientador, a sua generosidade e entusiasmo pela investigação, o apoio incansável e a palavra amiga e compreensiva, com que sempre me ajudou a trilhar nos caminhos da investigação. À Doutora Isabel Abreu e à Dr.^a Maria Jorge Arroz, um especial bem-haja pela amizade, pelo espírito alegre e entusiasta, e por todos os ensinamentos. Ao Doutor Paulo Fontoura, uma palavra de agradecimento pelo apoio e transmissão de conhecimentos. Aos restantes membros do Departamento, em especial à Doutora Paula Videira, às Dr.^{as} Catarina Martins e Helga Guimarães, e à Raquel Gomes, agradeço o companheirismo. No Departamento de Bioestatística da FCMUNL, agradeço à Doutora Ana Luísa Papoila por todos os seus ensinamentos e empatia.

No *Portex Department of Anaesthesia Intensive Therapy and Respiratory Medicine*: à Professora Janet Stocks, agradeço a sua orientação, sábia e rigorosa, e a capacidade de aceitar desafios e novas oportunidades. Ainda no seu departamento, agradeço à Doutora Ah Fong Hoo, pela sua constante ajuda, orientação e amizade, e cedência de diagramas utilizados.

No Serviço de Imunoalergologia do Hospital Dona Estefânia, onde fiz o Internato da Especialidade, agradeço ao Dr. Rosado Pinto, pela capacidade de liderança, entusiasmo, e pelo sempre constante estímulo e apoio na procura de novas experiências e actividades. À Dr.^a Paula Leiria Pinto, actual Coordenadora do Serviço e minha orientadora de formação, agradeço os ensinamentos que contribuíram para a minha formação, o incentivo constante, e as oportunidades que me proporcionou para que me dedicasse à investigação na minha área, e a amizade. Aos meus Colegas alergologistas, em especial à Dr.^a Ângela Gaspar, pela sua inestimável ajuda ao longo de todos estes anos, pela sua grandeza de espírito e dedicação e pela sua amizade, e ao Doutor Nuno Neuparth e à Dr.^a Ana Margarida Romeira, agradeço os conselhos e encorajamento constante.

No Serviço de Imunoalergologia do Hospital CUF Descobertas, onde também trabalho, quero deixar expressa a minha admiração e gratidão ao Dr. Mário Morais de Almeida, pela mestria da sua orientação clínica e científica, pelo constante apoio e encorajamento, e pela amizade. À Dr^a Cristina Santa-Marta, agradeço o seu apoio e amizade.

Agradeço a todas as crianças e respectivos pais pela participação neste estudo, esperando ter retribuído, na prestação de cuidados e assistência, bem como ter contribuído para o despertar da importância da investigação clínica, e na eventual aplicabilidade das conclusões deste estudo no Futuro a um maior número de crianças.

Às entidades que me honraram com o seu patrocínio, agradeço a sua confiança, nomeadamente à Schering-Plough Pharma, à Delta Cafés e à Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica.

À minha Mulher, Filipa, agradeço todo o amparo, amor, ternura e compreensão.

Aos meus filhos, Carolina e Francisco, devo a alegria, a emoção e a chamada constante para a essência da Vida.

Aos meus pais, Lurdes e João, agradeço o apoio incansável e a formação, a amizade, amor e carinho, e a palavra de conforto e disponibilidade incondicional.

A todos os restantes membros da minha Família, em especial aos meus padrinhos, Angelina e Adelino, e aos meus Amigos, agradeço o amor, a amizade e o carinho incessantes. Um agradecimento por todo o apoio aos amigos André, Soraia e João.

Lisboa, Junho de 2008

Luís Miguel Borrego

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviaturas/ símbolos	Descrição	Unidade
ACIU	Atraso de Crescimento intra-uterino	
ADAM 33	A Desintegrin and Metalloprotease 33 Desintegrina e Metaloprotease 33	
ADN	Ácido desoxiribonucleico	
AOAH	Aciloxil hidroxilase	
APC	Antigen Presenting Cell Célula apresentadora de antígeno	
ATS	American Thoracic Society	
°C	Graus Celsius	
CAMP	Childhood Asthma Management Programme	
CD	Cluster Differentiation	
C _L	Lung Compliance Compliance pulmonar	
cm	centímetro	
cpm	Ciclos por minuto	
C _{rs}	Compliance of the respiratory system Compliance do sistema respiratório	ml·kPa ⁻¹
C _t	Threshold cycle	
CTLA	Cyotoxic T lymphocyte-associated 4/ Molécula tipo 4 associada a linfócito T citotóxico	
DNA _{ase}	Enzima para clivagem de ADN	
DPP 10	Dipeptidylpeptidase 10 isoform 1/ Isoforma 1 da dipeptilpeptidase 10	
EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica	
ECHRS	European Community Health Respiratory Survey Estudo de Doenças Respiratórias na Comunidade Europeia	
EEL	End expiratory level Ponto do final da expiração	
ERS	European Respiratory Society	
FCMUNL	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa	
FEF	Forced expiratory flow Débito expiratório forçado	ml·s ⁻¹
FEFV	Forced expiratory flow-volume Curva débito-volume	

FEV	Forced expiratory volume Volume expiratório forçado	ml
FEV _t	Forced expiratory volume at time t Volume expiratório forçado, no tempo t	ml
FMO	Fluorescence minus one	
Foxp3	Forkhead/winged-helix family of transcriptional regulators Família dos reguladores de transcrição Forkhead/winged-helix	
FVC	Forced vital capacity Capacidade Vital Forçada	ml
FRC	Functional residual capacity Capacidade Residual Funcional	ml
GALEN	Global Allergy and Asthma European Network	
GINA	Global Initiative for Asthma	
GITR	Receptor para o TNF	
GM-CSF	Granulocyte- monocyte colony stimulation factor	
GPRA	G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility Receptor da proteína G associado a susceptibilidade para asma	
GWS	Genome Wide Screen	
H _e	Hélio	
HLA-G	G-protein coupled receptor for asthma susceptibility	
HLA	Human Leucocyte Antigen Antigénio Leucocitário Humano	
IC	Intervalo de Confiança	
Hz	Hertz	
IDO	Indolamina 2,3 dioxigenase	
IFN	Interferão	
Ig	Imunoglobulina	
IL	Interleucina	
IPEX	Imune Dysregulation Polyendocrinopathy, X linked syndrome Síndrome de desregulação immune e poliendocrinopatia ligada ao X	
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood	
ITE	Imunoterapia específica	
Kg	kilograma	
L	litro	
LOD score	Logaritmo de probabilidades	
LPS	Lipopolissacarido	
LTA	Linfotoxina	
mARN	Acidodesoxirribonucleico mensageiro	
MAS	German Multicentre Allergy Study	

MBW	Multiple Breath Washout	
MHC	Major Histocompatibility Complex Complexo Major de Histocompatibilidade	
MIF	Migration inhibitory factor	
ml	mililitro	
MOT	Multiple occlusion technique Técnica de oclusões múltiplas	
ms	milisegundo	
N ₂	Nitrogénio	
NCBI	National Center for Biotechnology Information	
NFAT	Factor de activação nuclear da célula T	
NHLBI	National Heart Lung Blood Institute	
NIH	National Institute of Health	
NK	Natural killer	
O ₂	Oxigénio	
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	
P	Pressão	kPa
P _{alv}	Pressão alveolar	
P _{ao}	Pressão nas vias aéreas	kPa
PCR	Reacção em cadeia da polimerase	
PD-L1	Programmed death ligand Ligando de morte programada	
PEF	Peak expiratory flow Débito expiratório máximo instantâneo	ml·s ⁻¹
P _{el}	Elastic recoil pressure Pressão de recolha elástica	kPa
PHF11	PHD finger protein 11 Proteína tipo PHD 11	
P _{inf}	Inflation pressure Pressão de insuflação	kPa
P _j	Jacket pressure Pressão do colete	kPa
PL	Pressão de recolha elástica do pulmão	
PMA	Acetato de forbolmiristato	
Ppl	Pressão pleural	
R _{aw}	Resistance of the airways Resistência das vias aéreas	kPa·l ⁻¹ ·s
R _L	Lung Resistance Resistência pulmonar	
R _{rs}	Resistance of the respiratory system Resistência do sistema respiratório	kPa·L ⁻¹ ·s
RTC	Rapid thoraco-abdominal compression Compressão rápida toraco-abdominal	

RVRTC	Raised volume RTC (technique) Técnica de compressão torácica em volume aumentado	
s	segundo	
SBT	Single (breath) occlusion technique Técnica de respiração única	
SNP	Polimorfismo de um só nucleótido	
SPINK5	Serine protease inhibitor kazal- type 5 precursor Percursor do inibidor da serina protease kazal tipo 5	
STAT-4	Signal transducer and activator of transcription 4 Transdutor de sinal e activador de transcrição tipo 4	
STAT-6	Signal transducer and activator of transcription 6 Transdutor de sinal e activador de transcrição tipo 6	
SVF	Soro de vitela fetal	
TCR	T cell receptor Receptor da célula T	
t_E	Expiratory time Tempo de expiração	s
T_{PEF}	Duration of forced expiration Duração da expiração forçada	s
TGF- β	Transforming growth factor Factor de transformação e crescimento	
Th	T helper	
T_{inf}	Tempo de insuflação do colete	
TLC	Total lung capacity Capacidade pulmonar total	ml
TNF	Tumor necrosis factor Factor de necrose tumoral	
TNFR	Receptor do TNF	
t_{PTEF}	Time to peak tidal expiratory flow Tempo para atingir o débito expiratório máximo instantâneo	kPa
Tr	T reguladoras	
UTR	Regiões não traduzidas	
V	Volume	ml
V'	Flow Débito	$ml \cdot s^{-1}$
V'_{maxFRC}	Maximal flow at functional residual capacity Débito máximo à CRF	$ml \cdot s^{-1}$
V_T	Tidal volume Volume corrente	ml
Z score	Desvio padrão do Score de distribuição de uma população entre -2 (Percentil 3) e +2 (percentil 97)	
μg	micrograma	
μl	microlitro	

ÍNDICE

	RESUMO	1
1.	INTRODUÇÃO	5
1.1.	Conceitos sobre sibilância recorrente	5
1.1.1.	Definição e epidemiologia da sibilância recorrente	5
1.1.2.	Fenótipos de sibilância recorrente na infância	5
1.1.3.	Factores de risco para asma em lactentes com sibilância recorrente	9
1.1.4.	Índice preditivo da asma brônquica na infância	13
1.2.	Conceitos sobre asma brônquica	14
1.2.1.	Perspectiva histórica da definição de asma brônquica	14
1.2.2.	Epidemiologia da asma brônquica	19
1.3.	Conceitos sobre a relação entre o sistema imune e asma	22
1.3.1.	Generalidades sobre o sistema imune	22
1.3.2.	O conceito de alergia	23
1.3.3.	A resposta imune alérgica	24
1.3.4.	Hipótese higiénica	25
1.3.5.	Populações de células reguladoras	28
1.3.6.	Papel das células reguladoras na asma e doenças alérgicas	35
1.4.	Conceitos sobre a genética da asma brônquica	41
1.4.1.	Estudo da genética da asma: <i>Genome Wide Screen</i>	47
1.4.2.	Estudos de associação à asma com candidatos biológicos	61
1.5.	Provas de função respiratória	66
1.5.1.	Fisiologia respiratória do lactente	68
1.5.2.	Particularidades dos exames funcionais respiratórios no lactente	68
1.5.3.	Provas da função respiratória e aplicações	69
1.5.4.	Factores que influem a função e desenvolvimento pulmonar na infância	80
1.6.	Objectivos e hipóteses do estudo	83
2.	MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1.	Recrutamento da população em estudo	84
2.1.1.	Critérios de inclusão	85
2.1.2.	Critérios de exclusão	85
2.2.	Aprovação do Conselho de Ética	85

2.3.	Consentimento informado	85
2.4.	Questionário	86
2.4.1.	Antecedentes pessoais	86
2.4.2.	Antecedentes familiares	87
2.4.3.	Exposição tabágica	87
2.5.	Equipamento do Laboratório de Exploração Funcional Respiratória	87
2.5.1.	Equipamento de monitorização e ressuscitação	87
2.5.2.	Equipamento para avaliação da função respiratória	88
2.5.3.	Equipamento para manobras expiratórias forçadas	88
2.6.	Provas funcionais respiratórias	90
2.6.1.	Agendamento das provas de funcionais respiratórias	90
2.6.2.	Preparação para o exame de função respiratória	91
2.6.3.	Oximetria de pulso	91
2.6.4.	Medições antropométricas	91
2.6.5.	Protocolo de sedação	92
2.6.6.	Aplicação da máscara facial	92
2.6.7.	Detecção e eliminação de fugas	92
2.6.8.	Medições em volume corrente	95
2.6.9.	Medição da Capacidade Residual Funcional (FRC)	95
2.6.10.	Manobras expiratórias forçadas	96
2.7.	Avaliação laboratorial	104
2.7.1.	Colheita de sangue periférico	104
2.7.2.	Avaliação do hemograma	104
2.7.3.	Doseamento de IgE total e IgE específicas para alérgenos alimentares e aeroalérgenos	104
2.7.4.	Preparação de amostras para citometria de fluxo	105
2.7.5.	Culturas celulares com estimulação específica e inespecífica	110
2.7.6.	Extracção ARN de células mononucleares	112
2.7.7.	Análise da expressão de genes imunoreguladores por PCR quantitativo (RT Real Time PCR)	114
2.7.8.	Extracção ADN de sangue periférico	116
2.7.9.	Análise de polimorfismos de Nucleótidos Singulares (SNPs) genómicos por química Taqman	117
2.7.10.	Medição de cotinina urinária	119

2.7.11.	Análise estatística	120
3.	RESULTADOS	122
3.1.	Caracterização da amostra em estudo	122
3.2.	Provas funcionais respiratórias	127
3.2.1.	Comparação entre os grupos de crianças saudáveis	127
3.2.2.	Comparação entre o grupo de crianças com sibilância recorrente e o grupo de crianças saudáveis	129
3.2.3.	Comparação entre os subgrupos de crianças com sibilância recorrente (alto risco e baixo risco para asma) e o grupo de crianças saudáveis	132
3.2.4.	Comparação entre os subgrupos de crianças com sibilância recorrente: alto risco e baixo risco para asma	133
3.3	Avaliação laboratorial	139
3.3.1.	Doseamento de IgE total e IgE específicas para aeroalergénios e alergénios alimentares	142
3.3.2.	Estudo de populações celulares por citometria de fluxo	144
3.3.3.	Expressão de mARN para citocinas, CTLA-4 e Foxp3 após culturas celulares	156
3.3.4.	Estudo de polimorfismos	167
4.	DISCUSSÃO	171
4.1.	Recrutamento da amostra em estudo	171
4.2.	Provas de função respiratória	173
4.3.	Avaliação laboratorial	179
4.3.1.	Citometria de fluxo	180
4.3.2	Expressão de mARN para CTLA-4, Foxp3 e citocinas	184
4.3.3	Estudo de polimorfismos	189
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	193
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	195

RESUMO

Nos últimos anos têm sido identificados vários factores de risco para asma brônquica em crianças com sibilância recorrente, não se encontrando clara a importância da avaliação funcional respiratória nestas crianças. De igual modo, têm sido documentados resultados contraditórios na avaliação imunológica das populações de células reguladoras bem como na expressão de polimorfismos para a asma. O objectivo deste estudo consistiu na avaliação e comparação de parâmetros de avaliação funcional respiratória, imunológica e de polimorfismos genéticos em crianças entre 8 e 20 meses de idade, com três ou mais episódios de sibilância (n=50), sem qualquer terapêutica anti-inflamatória prévia, diagnosticados por um médico, com e sem factores de risco para asma brônquica (história de asma parental ou história pessoal de eczema ou pelo menos dois dos seguintes: história pessoal de rinite alérgica, sibilância fora do contexto infeccioso e contagem de eosinófilos no sangue periférico > 4%), comparados com um grupo controlo (n=30). Nestas crianças foram efectuadas provas de função respiratória em volume corrente e em volume aumentado através de técnicas de compressão torácica, avaliação de populações celulares por citometria de fluxo, expressão de citocinas por mRNA em culturas de células estimuladas com PMA (leitura às 24 horas) e com extractos de ácaros do pó doméstico (leitura ao 7º dia) e expressão de polimorfismos para alguns genes associados a asma (ADAM 33, DPP10, GPRA). Na comparação entre as crianças com sibilância recorrente em relação ao grupo controlo foram observadas reduções significativas nos Z-scores para FVC (diferença média [95% IC]: -0,7 [-1,2; -0,1], p=0,01), FEV_{0.5} (-1,0 [-1,5; -0,5], p=0,0001), FEF₇₅ (-0,6 [-1,0; -0,2], p=0,0001) e FEF₂₅₋₇₅ (-0,8 [-1,2; -0,4], p=0,0001), bem como valores significativamente mais baixos para a quantificação do número absoluto de CD4⁺CD25^{forte} (-47,9 [-89,6; -6,1], p=0,03), do número absoluto e percentual de CD4⁺CD25⁺CTLA-4 (p=0,0001) e da expressão de CTLA-4 (p=0,03) e IFN- γ (p=0,04) nas culturas com extractos de ácaros. As crianças sibilantes com alto risco para asma tinham, em relação ao grupo sem factores de risco, Z-scores significativamente mais baixos para FVC (-0,7 [-1,4; -0,04], p=0,04) e FEF₂₅₋₇₅ (-0,6 [-1,2; -0,1], p=0,03),

valores significativamente inferiores do número absoluto das populações CD4⁺CD25⁺ (-118,8 [-210,0; -27,5], p=0,01) e CD4⁺CD25^{forte} (-56,2 [-109,9; -2,5], p=0,04) e ainda uma expressão diminuída de IFN- γ (p=0,03) em culturas de células estimuladas com extractos de ácaros. Foram encontradas diferenças na expressão de polimorfismos para os genes GPRA e ADAM 33, não sendo possível tecer extrapolações pelo reduzido número de crianças em estudo. As crianças com sibilância recorrente e alto risco de asma apresentavam alterações na avaliação funcional respiratória, bem como no número absoluto de populações celulares com função reguladora e na expressão de IFN- γ em culturas celulares estimuladas com extractos de ácaros. Estes resultados realçam a eventual importância da avaliação das provas de função respiratória e de parâmetros imunológicos, em crianças com sibilância recorrente e alto risco clínico para asma, nos primeiros dois anos de vida, apesar da sua controversa aplicabilidade individual. O seguimento prospectivo destas crianças poderá aferir o seu valor preditivo para asma em idade escolar.

ABSTRACT

Although several risk factors for asthma have been identified in infants and young children with recurrent wheeze, the relevance of assessing lung function in this group remains unclear. In addition, published literature has reported contradictory findings regarding the evaluation of regulatory cells and genetic polymorphisms for asthma. The aim of this study was to assess and compare lung function and immunological parameters and genetic polymorphisms in steroid naïve young children from 8 to 20 months with ≥ 3 episodes of physician confirmed wheeze (n=50), with and without clinical risk factors for developing subsequent asthma (i.e., parental asthma or personal history of eczema, and/or two of the followings: wheezing without colds, personal history of allergic rhinitis and peripheral blood eosinophil count $> 4\%$), with age-matched healthy controls (n=30). Peripheral airway function was assessed using forced expiratory flows and volumes (FEFV), obtained using the tidal and raised-volume rapid thoraco-abdominal compression (RTC) manoeuvres. Blood samples were obtained to investigate immunological and genetic status by evaluating regulatory cell populations using flow cytometry, cytokine expression after peripheral mononuclear cell stimulation with PMA (at 24hours) and house dust mite extracts (HDM) (7th day) and expression of polymorphism of genes associated to asthma (ADAM 33, DPP10, GPRA). After adjustment for sex, age and body size, Z-scores for FVC (mean difference [95% CI]: -0.7 [-1.2; -0.1], p=0.01), FEV_{0.5} (-1.0 [-1.5; -0.5], p=0.0001), FEF₇₅ (-0.6 [-1.0; -0.2], p=0.0001) and FEF₂₅₋₇₅ (-0.8 [-1.2; -0.4], p=0.0001) were significantly lower in the wheezy group when compared with the control group. Similarly, significant reductions in the numbers of CD4⁺CD25^{high} (-47.9 [-89.6; -6.1], p=0.03) and CD4⁺CD25⁺CTLA-4 (p=0.0001) were observed. The expression of CTLA-4 (p=0.03) and IFN- γ (p=0.04) were diminished in those with recurrent wheeze when compared with controls. In the subgroup of wheezy children with risk factors for asthma, significantly lower Z-scores for FVC (-0.7 [-1.4; -0.04], p=0.04) and FEF₂₅₋₇₅ (-0.6 [-1.2; -0.1], p=0.03) as well as significant reductions of absolute numbers of CD4⁺CD25⁺ (-118,8 [210,0; -27,5], p=0.01), CD4⁺CD25^{high} (-56,2 [-109,9; -2,5], p=0.04) and lower expression of IFN- γ

($p=0.03$) in cultured cells with HDM were observed when compared with those without such risk factors. Differences in the expression of polymorphisms for GPRA and ADAM 33 were found, although it was not possible to make any extrapolation due to the relatively small number of children in this study. Peripheral airway function, absolute number of regulatory cells and IFN- γ expression in cultured cells with HDM were significantly reduced in young children with recurrent wheeze with risk factors for asthma. These findings emphasise the eventual importance of the evaluation of lung function tests and immunological parameters in children with recurrent wheeze and clinical high risk for asthma, during the first two years of life, although its controversial individual applicability. The prospective follow-up of these children will provide more information about its predictive value for asthma in school age.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conceitos sobre sibilância recorrente

1.1.1. Definição e epidemiologia da sibilância recorrente

A sibilância recorrente é uma entidade muito frequente na criança.¹⁻⁸ A “sibilância” é um sintoma não específico, que constitui a tradução clínica de uma obstrução das vias aéreas distais.

Na grande maioria dos casos, a sibilância surge associada a infecções víricas, de carácter transitório, definindo-se como recorrente quando se documenta a existência de pelo menos três episódios espaçados no tempo, com intervalos livres de sintomas respiratórios entre estes. Nos países desenvolvidos estima-se que esta entidade clínica atinja entre 30 a 50% das crianças durante os 3 primeiros anos de vida.^{7,8}

Escasseiam estudos epidemiológicos efectuados nesta faixa etária em Portugal. Destaca-se um estudo recente, avaliando uma amostra de 5018 crianças em idade pré-escolar, entre os 3 e os 5 anos, no qual foi identificada uma prevalência de sibilância nos últimos 12 meses de 24,5%.⁵

A sibilância recorrente nos primeiros anos de vida pode traduzir a primeira manifestação de asma.^{9,10} Embora habitualmente associada a um bom prognóstico, cerca de 40% das crianças com sibilância antes dos 3 anos mantêm queixas respiratórias aos 6 anos de idade.^{7,11} Ressalve-se ainda que a maioria dos asmáticos reporta o início da sintomatologia para os primeiros anos de vida¹² e que o início precoce do quadro se associa à sua persistência e deterioração da função pulmonar na vida adulta.¹³⁻¹⁵

Deste modo, seria muito útil conseguir identificar precocemente as diferentes formas de sibilância pediátrica, bem como o respectivo prognóstico, pelas implicações na abordagem médica e do ponto de vista terapêutico.⁷

1.1.2. Fenótipos de sibilância recorrente na infância

A apresentação clínica dos lactentes com sibilância recorrente não nos dá informação quanto aos diferentes fenótipos de sibilância, mas o seu conhecimento mais profundo

permitirá dar informações mais precisas aos pais destas crianças, bem como perspectivar uma prevenção primária e secundária da asma brônquica.

O estudo prospectivo longitudinal efectuado nos Estados Unidos da América por Martinez e colaboradores^{7,16,17} a partir do recrutamento de recém-nascidos saudáveis (Estudo de Tucson - “*Tucson Children’s Respiratory Study*”) permitiu a identificação de diferentes fenótipos em crianças sibilantes.

Este estudo foi iniciado nos anos 80, com 1246 lactentes,^{7,16,17} e compreendeu a realização de um inquérito inicial sobre história familiar de asma e tabagismo materno na gravidez, questionários sucessivos sobre sintomas respiratórios e doenças atópicas preenchidos pelos pais, observação clínica periódica, bem como realização de estudos de função respiratória, efectuados precocemente nos primeiros meses de vida previamente a qualquer sintomatologia.

Foram definidos três grupos clássicos de sibilantes: sibilantes transitórios, sibilantes não atópicos e sibilantes persistentes (Figura 1).^{9,18} Os diferentes fenótipos de sibilância são influenciados pelos antecedentes genéticos e interferências ambientais.^{19,20}

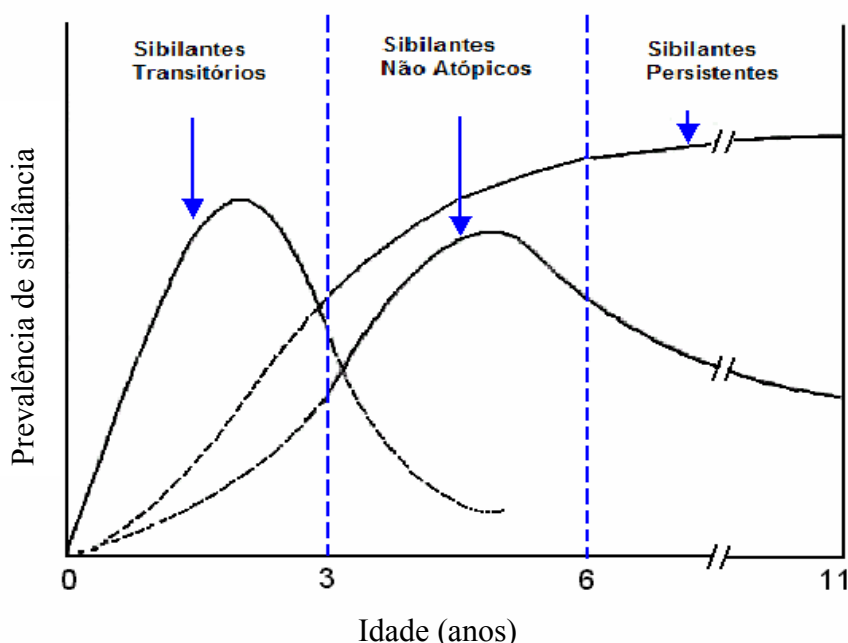


Figura 1- Distribuição de crianças com sibilância recorrente por fenótipo e de acordo com a idade (adaptado de Stein e colaboradores, 1997).¹⁸

Os **sibilantes transitórios** são as crianças em que a ocorrência de sibilância é episódica, surgindo habitualmente no primeiro ano de vida no decurso de infecções respiratórias de etiologia viral.⁹ A gravidade clínica de cada episódio não é diferente do que ocorre na sibilância persistente, afirmando a maioria dos autores que a gravidade das crises durante o primeiro ano de vida não é factor de risco para persistência dos sintomas.²¹⁻²³

Correspondem a cerca de 60% dos sibilantes com menos de 3 anos de idade, ficando habitualmente assintomáticos em idade escolar. Não apresentam maior incidência de história familiar ou pessoal de alergias em relação às crianças que não têm clínica nos primeiros 6 anos de vida.^{7,24}

Estas crianças têm uma função pulmonar diminuída^{7,24} na infância devido à presença de alguns factores, tais como prematuridade²⁵ e exposição pré²⁶⁻²⁸ ou pós natal^{29,30} ao fumo de tabaco.

Foi também demonstrado que as crianças do sexo masculino têm maior incidência de sibilância transitória na infância, por condicionantes anatómicos, uma vez que o calibre das vias aéreas é inferior ao do sexo feminino.^{11,24} Outros factores associados a sibilância transitória na infância são a frequência de infantário ou convivência com irmãos que frequentem infantário,³¹ a ausência de aleitamento materno, pelo conhecido efeito protector anti-infeccioso,^{11,24,32} e ainda a idade materna, porquanto filhos de mães jovens têm maior incidência de sibilância recorrente em relação a mães mais velhas, desconhecendo-se a causa para este facto.^{11,24,33}

Os **sibilantes não atópicos** são um grupo de crianças que apresentam sibilância intermitente nos primeiros anos de vida, correspondendo a cerca de 20% dos sibilantes com menos de 3 anos de idade, apresentando na sua quase totalidade remissão do quadro até à adolescência.^{16,34,35} Os sintomas ocorrem habitualmente no contexto de infecções respiratórias virais, associadas a hipersusceptibilidade brônquica. Estas crianças não apresentam história familiar de asma e/ou alergias, nem maior risco de sensibilização ou elevados níveis de IgE.^{16,19,36}

Os **sibilantes persistentes** correspondem a 20% das crianças com sibilância recorrente nos primeiros 3 anos de vida, tendo um terreno atópico (tendência pessoal e/ou familiar

para a produção de anticorpos da classe IgE dirigida contra aeroalergénios ambientais) e mantendo sibilância aos 6 anos de idade.⁷

A maioria das crianças com asma em idade escolar e na vida adulta iniciam os sintomas nos primeiros 6 anos de vida. Portanto, estas crianças são inicialmente indistinguíveis dos restantes sibilantes (transitórios e não atópicos) durante os primeiros 3 anos de vida. No entanto, os sibilantes persistentes tendem a iniciar a sua sintomatologia um pouco mais tarde que os restantes, durante o segundo e terceiro anos de vida. Estas crianças têm crises independentemente do contexto infeccioso e quando comparados com os restantes grupos têm uma probabilidade quatro vezes superior de história familiar de asma e duas a três vezes superior de história pessoal de atopia e/ou eczema atópico.⁷

A sensibilização alérgica aumenta a prevalência de sintomatologia respiratória, inflamação crónica das vias aéreas e risco de remodelação com declínio da função respiratória precocemente na vida.^{7,37-40}

Os sibilantes persistentes atópicos apresentam-se como um grupo que tem elevada prevalência de eosinofilia no sangue periférico,⁴¹ níveis elevados de IgE e história familiar e pessoal de atopia.

Recentemente foi descrito por Bacharier e colaboradores a existência de um quarto fenótipo de sibilância recorrente, designado de **sibilância intermitente grave** que compreende um grupo de crianças que apesar de ter episódios pouco frequentes de sibilância, se demarcam pela sua apresentação grave.^{3,42}

Este grupo de crianças apresenta-se praticamente assintomático entre os episódios de sibilância mas tem terreno atópico, elevada prevalência de eczema, sensibilização alérgica e eosinofilia periférica.^{3,42}

Nestes casos, Devulapalli e colaboradores documentaram que a gravidade dos episódios de sibilância nos primeiros dois anos de vida constitui um factor preditivo para asma aos 10 anos de idade.⁴³

1.1.3. Factores de risco para asma em lactentes com sibilância recorrente

A sibilância recorrente surge como uma entidade complexa e intrigante, sendo muito importante a identificação de possíveis factores de risco para a persistência dos sintomas respiratórios nestas crianças que tenham valor prognóstico quanto à evolução da doença.

Têm sido identificados, em vários estudos prospectivos, factores de risco para asma, que serão seguidamente explanados.

História familiar de asma

A história familiar de asma tem sido um dos factores mais frequentemente implicados na persistência dos sintomas respiratórios em vários estudos prospectivos internacionais.

No estudo prospectivo de Tucson, a história materna de asma constituiu um factor para persistência de sintomatologia aos 6 anos de idade, mantendo-se a história parental como um dos principais factores de prognóstico para asma activa aos 13 anos de idade.^{7,44,45} No estudo de Otago (Nova Zelândia) que acompanhou 1037 recém-nascidos, a história de asma materna foi o principal factor de risco para asma activa aos 18 anos de idade.⁴⁶

O estudo MAS (*German Multicentre Allergy Study*) realizado na Alemanha, englobando 1314 recém-nascidos, comprovou a história parental de asma como um factor muito importante para a evolução da doença.⁴⁷

Em Portugal, foi efectuado no Hospital de Dona Estefânia um estudo prospectivo com oito anos de duração, no qual foram acompanhadas 308 crianças com idade inferior a 6 anos e diagnóstico clínico de sibilância recorrente. Foi demonstrado que a história parental de asma (paterna e materna), constituía um factor de risco independente para asma activa em idade escolar.⁶

A possibilidade do risco de asma ser mais elevado em crianças filhas de mães asmáticas comparativamente a pais asmáticos tem sido desde há vários anos discutida.^{7,39,45,48,49}

Foi demonstrado que pode existir uma partilha de alelos preferencialmente maternos, podendo também ocorrer uma modificação fenotípica do feto ou do recém-nascido, através da placenta ou durante a amamentação, condicionada pelo contacto “íntimo” com a mãe.⁵⁰

Pelo contrário, num estudo efectuado em 6665 famílias alemãs, foi encontrado um risco relativo mais elevado associado à existência de pai asmático.⁵¹

Sexo masculino

A prevalência de sibilância é maior no sexo masculino por características anatómicas que se prendem com um menor calibre das vias aéreas na infância (traduzido na relação calibre brônquico/volume pulmonar),^{7,46,47} que se vai progressivamente atenuando até à adolescência.

No estudo de Tucson constatou-se que as crianças do sexo masculino tinham um risco acrescido de persistência da sintomatologia respiratória aos 6 anos, não existindo diferenças significativas na prevalência de asma activa entre os dois sexos aos 13 anos de idade.⁴⁴

História pessoal de rinite alérgica e/ou eczema atópico

No estudo de Tucson foram comprovados como factores de risco significativos para asma persistente, a presença de eczema atópico e rinite alérgica.^{7,44,52}

A presença de eczema atópico surgiu em vários estudos como um factor de risco muito importante para a persistência de sibilância.⁵²⁻⁵⁴

No estudo de Morais-Almeida e colaboradores, a história pessoal de rinite alérgica e eczema atópico também constituíram factores de risco para asma activa em idade escolar, com um peso predominante da rinite.⁶

IgE total sérica elevada e eosinofilia no sangue periférico

A existência de níveis elevados de IgE total sérica e eosinofilia periférica durante os primeiros anos de vida foram considerados factores de risco para asma brônquica.^{7,39}

Vários estudos de coorte de recém-nascidos, realizados em diferentes países, têm demonstrado que níveis elevados de IgE total estão associados a um risco acrescido de asma brônquica.^{39,46,55-58}

Por outro lado, também tem sido demonstrado que a existência de eosinofilia no sangue periférico se traduz como um factor preditivo para a persistência de sibilância recorrente até à idade escolar, ou seja como um factor preditivo para asma brônquica.⁵⁹⁻⁶²

Refira-se que as infecções gastrointestinais a helmintas estão associadas ao aumento de IgE total e a eosinofilia periférica. No entanto, são mais frequentes nos países tropicais e subtropicais, havendo uma forte associação com más condições sanitárias e pobreza, sendo prevalentes em idade pré-escolar e escolar.⁶³

Sensibilização alérgica a aeroalergénios

A sibilância recorrente nos primeiros anos de vida tem um prognóstico favorável desde que não exista sensibilização alérgica, uma vez que a sua presença tem valor diagnóstico e prognóstico da asma brônquica infantil. A sensibilização alérgica foi correlacionada com a existência de asma em idade escolar, com tradução na alteração da função respiratória,³⁷ e em idade adulta.³⁹

A sensibilização alérgica pode surgir muito precocemente a partir das 22 semanas de gestação, precedendo o início das queixas respiratórias.⁶⁴ O contrário pode também ocorrer, ou seja a clínica pode preceder, em anos, o aparecimento de sensibilização alérgica.⁶

Num estudo efectuado na Alemanha demonstrou-se que as determinações dos alérgenos de ácaros no quarto das crianças no primeiro ano de vida se relacionavam com a subsequente sensibilização e asma, apresentando estas medições um valor preditivo para asma activa aos 11 anos de idade.⁶⁵

A existência de sensibilização a alérgenos inalantes (ácaros, cão e gato) foi identificada como factor de risco para asma aos 7 anos de idade.^{47,52,57,58,66-70}

Quanto à exposição precoce a animais de companhia, a sua relação com asma permanece controversa. Alguns autores demonstraram que a exposição no domicílio a estes animais nos primeiros dois anos de vida aumentava o risco de asma,⁷¹ ao passo que outros lhe reconheceram um efeito protector.^{72,73} Saliente-se que no estudo de Tucson, a exposição ao cão desde o nascimento foi identificada como um factor protector para a expressão de asma, mas apenas em crianças sem asma parental.⁷²

No estudo prospectivo efectuado no Hospital de Dona Estefânia, a presença de sensibilização alérgica, maioritariamente aos ácaros do pó, foi um factor de risco significativo para asma activa em idade escolar.⁶

Sensibilização alimentar

No estudo alemão MAS foram identificados como factores de risco para asma aos 7 anos de idade a sensibilização a alérgenos alimentares.^{47,66,74}

A sensibilização a alérgenos alimentares (leite e ovo), em idades mais jovens é em regra transitória, surgindo mais tarde, nestas crianças, a sensibilização a aeroalérgenos, de modo permanente. A sensibilização alimentar antes dos 2 anos de idade tem sido referida como factor de risco para o aparecimento precoce de sensibilização a alérgenos inalantes.⁷⁰

Noutro estudo, identificou-se a alergia ao ovo durante o primeiro ano de vida como um factor preditivo para sensibilização a alérgenos inalantes antes dos 3 anos de idade.⁷⁵

Num estudo de San Diego, a sensibilização ao leite ou ao amendoim constituíram factores de risco para asma.⁷⁶

Exposição ambiental ao fumo de tabaco

A exposição da criança ao fumo de tabaco, especialmente no caso de se tratar de mãe fumadora,^{7,47;77-79} aumenta o risco de sensibilização alérgica^{80,81} e de asma brônquica, pelo maior tempo de permanência da mãe em casa e com a criança nos seus primeiros

anos de vida.^{78,82} O risco reveste-se de maior importância no caso de a exposição ocorrer *in utero*, dependendo também da sua duração e intensidade.⁸³

O tabagismo materno foi identificado como factor de prognóstico associado a persistência dos sintomas respiratórios em idade escolar nos estudos de Tucson⁷ e MAS.⁴⁷

A exposição tabágica acarreta diminuição da função pulmonar,^{79,84,85} aumento da hipersusceptibilidade brônquica,^{79,84} aumento do número de agudizações,^{77,79,85} de recursos ao serviço de urgência^{77,86} e de internamentos hospitalares.⁸⁷⁻⁸⁹

A determinação dos níveis de cotinina urinária em crianças asmáticas expostas a fumo de tabaco permite confirmar a relação entre exposição e morbidade da doença.⁸⁵

Infecções respiratórias virais

O papel das infecções respiratórias virais como factor de risco para asma na criança é controverso. Alguns autores apontam o vírus sincicial respiratório (VSR)⁹⁰ como predisponente para o aparecimento de asma, enquanto outros defendem um efeito protector.⁹¹

A ocorrência de bronquiolite grave, requerendo internamento hospitalar, é um factor de risco independente para asma activa aos 7 anos de idade.⁹²

Refira-se que no estudo de Tucson, as crianças inseridas num agregado familiar numeroso ou com frequência de infantário antes dos 6 meses de idade tinham uma menor probabilidade de ter asma mais tarde na vida.³¹ Resultados semelhantes foram encontrados no estudo prospectivo português.⁶

Por outro lado, no estudo MAS, a ocorrência de infecções respiratórias altas durante os 3 primeiros anos de vida, associou-se a uma menor incidência de asma e sensibilização alérgica aos 7 anos de idade.⁹³

1.1.4. Índice preditivo de asma brônquica na infância

Os estudos sobre a história natural da asma identificaram factores de risco para a asma persistente. No estudo de Tucson foi efectuada uma optimização estatística a partir dos

factores de risco obtendo-se um índice clínico preditivo de asma com 77% de valor preditivo positivo e 97% de especificidade, em crianças nos 3 primeiros anos de vida com sibilância recorrente no ano anterior, que tenham pelo menos 1 critério major ou 2 critérios minor referidos na Tabela I.⁴⁴

Tabela I - Índice preditivo para asma brônquica em crianças com sibilância recorrente.⁴⁴

Crítérios Major	Crítérios Minor
Asma parental	Rinite alérgica
Eczema atópico	Sibilância fora de contexto infeccioso
	Eosinofilia periférica > 4%

Existem outros índices preditivos de asma publicados que utilizam para além dos parâmetros referidos outros parâmetros imunológicos⁹⁴ ou clínicos,⁶ mas a sua aplicação na prática clínica diária torna-se difícil. Morais-Almeida e colaboradores publicaram um índice preditivo para asma em idade escolar, utilizando vários parâmetros clínicos, obtidos a partir do estudo prospectivo com oito anos de duração, de crianças com sibilância recorrente nos primeiros 6 anos de vida.⁶

1.2. Conceitos sobre asma brônquica

1.2.1. Perspectiva histórica da definição de asma brônquica

A palavra asma foi enunciada pela primeira vez por Homero, significando ofegante, com dificuldade de respiração.⁹⁵ No entanto, só foi reconhecida do ponto de vista científico por Hipócrates (460-370 a.C.),⁹⁶ que a descreveu como um ataque paroxístico, de carácter grave e espasmódico.

Galeno e Arateus de Capadócia (150 a.C.), ilustres médicos da cidade de Roma, constataram que a asma era mais frequente no Inverno e agravava à noite.⁹⁶

Durante a Idade Média, Maimonides (1135-1204), judeu oriundo de Espanha e estabelecido no Cairo como médico do Sultão do Egipto e da Síria, escreveu o tratado

da asma, em que destaca a importância da poluição do ar da cidade do Cairo como responsável pela doença do príncipe.⁹⁷⁻¹⁰⁰

Durante o séc. XII a escola médica de Salerno, muito famosa na Idade Média, definia asma como uma doença em que a respiração era difícil e pesada, acompanhada de tosse, por grande estreitamento e obstrução do pulmão.⁹⁵

Na época renascentista, Paracelsus (1493-1541), o pai da Farmacologia, descreveu os tratamentos mais eficazes para a asma, no sentido de reverter a obstrução do pulmão, passando pela utilização de destilação de tártaro cru em álcool de vinho ou em casos mais graves, inalações de enxofre.¹⁰¹

A patogenia da asma foi descrita séculos mais tarde por Von Helmont (1577-1644), asmático e discípulo de Paracelsus, tendo sido o primeiro a localizar a doença nos brônquios. Relatou casos clínicos de doentes com dificuldade respiratória após inalação de poeiras, especialmente no decurso de demolições de templos e ainda um caso de dificuldade respiratória após ingestão de peixe.¹⁰²

Thomas Willis (1621-1675), reconhecido anatomofisiologista, descreveu dois tipos de asma: a asma *mere penumonicum* e a asma *mere convulsivum*, sendo a primeira devida a uma verdadeira obstrução brônquica e a segunda de etiologia nervosa, que definia sem obstrução.

Durante o séc. XVIII, vários cientistas focaram a importância da exposição ambiental a fumos e poeiras para o aparecimento da asma, destacando-se Bernardino Ramazzini, considerado o pai da medicina ocupacional, pelas suas descrições precisas de doenças que ocorriam pela exposição a poeiras, colchões velhos e roupas empoeiradas. Para Ramazzini a exposição ambiental constituía o estímulo para a obstrução brônquica.

No séc. XIX René Laennec (1781-1826) definiu asma como a dificuldade em respirar que surge pela contração de fibras musculares por estimulação nervosa.

Neste século surgiram inovações terapêuticas propostas por Trousseau (1811-1867) que defendia a utilização de cigarros de arsénico, éter, clorofórmio e vapores de nitrato de potássio para o tratamento desta entidade, da qual ele próprio sofria, descrevendo uma das suas piores crises precedida de lacrimejo e esternutos, na sequência de exposição a

palha quando visitava um palheiro. Este cientista alertou também para a possibilidade das crises serem desencadeadas em alguns indivíduos pela exposição a gato ou coelho. O estímulo ambiental seria o responsável pelo desencadear da obstrução.

Henry Slater (1823-1871), asmático que viria a falecer no decurso de uma crise, foi o primeiro a alertar para a possibilidade da existência de asma cardíaca, distinguindo-a da asma brônquica, uma vez que esta última tinha períodos de normalidade entre as crises e poderia ser tratada com café forte.

Sir William Osler (1849–1919) defendia os mesmos conceitos que Slater, tendo inclusivamente colocado a possibilidade da asma ser condicionada por factores psicogénicos.

Charles Blackley (1820–1900), médico reconhecido em Manchester, definiu posteriormente a asma dos fenos, como sendo desencadeada pela exposição aos pólenes.

Só durante o séc. XX surgiram as primeiras definições mais específicas e abrangentes desta entidade, cujo entendimento fisiopatológico proporcionou as sucessivas modificações na sua definição.

O melhor entendimento desta doença deveu-se ao contributo de diversos investigadores tal como Paul Ehrlich (1854-1915), prémio Nobel da Medicina em 1908, que identificou o mastócito, célula de suma importância para as doenças alérgicas.

A descoberta da histamina por Adolf Windaus e Karl Vogt¹⁰³ e o reconhecimento do seu envolvimento na patogénese das doenças alérgicas por Patrick Laidlaw e Henry Dale¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ rasgaram novos horizontes para a sua compreensão.

O termo alergia surgiu graças a von Pirquet em 1903, como definição para a reacção de hipersensibilidade decorrente da exposição a um alergénio. Mais tarde Coca (1875-1959) e Cooke (1880-1960) introduziram o termo atopia para as reacções de hipersensibilidade com cunho hereditário, clarificando o carácter familiar da asma.^{107,108} Charles Richet e Paul Portier, contemporâneos de von Pirquet, descreveram as substâncias responsáveis por reacções de hipersensibilidade como proteínas *in natura*.

No final da década de 50 decorreu a reunião da *Ciba Foundation Guest Symposium* da qual emergiu a caracterização da doença como “uma constrição generalizada das vias aéreas intrapulmonares, com modificações da gravidade em curtos períodos de tempo, quer espontâneas, quer sob acção terapêutica, excluindo-se as doenças cardiovasculares”.¹⁰⁹

Nos últimos anos da mesma década, Haydon Carrier e colaboradores demonstraram num ensaio clínico controlado e em dupla ocultação, a eficácia da cortisona intramuscular para o tratamento da asma grave, não sendo no entanto ainda compreendido o seu mecanismo de acção nem a razão da eficácia da sua utilização.¹¹⁰

Na década de 60, a *American Thoracic Society* definiu a asma como “uma resposta exagerada da traqueia e brônquios a diversos estímulos, traduzida por uma obstrução generalizada das vias aéreas, por excessiva contracção do músculo liso e hipersecreção de muco, reversível espontaneamente ou sob efeito da terapêutica”.¹¹¹

A asma foi deste modo concebida como uma síndrome clínica caracterizada por uma hipersusceptibilidade da árvore traqueobrônquica a uma variedade de estímulos, entendendo-se a mesma como uma patologia centrada na obstrução brônquica.

Em 1960, foi descrito por Gowans o papel do linfócito como principal célula imunocompetente, bem como o desenvolvimento de técnicas *in vitro* de reacções linfoproliferativas para o estudo dos mediadores libertados pelo linfócito.^{112,113}

Ainda na década de 60, foram classificadas as reacções de hipersensibilidade por Gell e Coombs, e foi identificada a Imunoglobulina E pelo casal Ishizaka¹¹⁴ nos Estados Unidos da América, e simultaneamente por Johanson na Suécia,¹¹⁵ sendo oficializada a descoberta da 5ª imunoglobulina na Conferência da Organização Mundial de Saúde no ano de 1968, em Lausanne.

No final dos anos 60, foi descrito o primeiro mediador libertado pelos linfócitos por David,¹¹⁶ sendo designado por MIF (*migration inhibitory factor*). Estes mediadores passaram a ser designados por linfocinas por Dumonde¹¹⁷ e colaboradores, tendo surgido posteriormente o termo citocina proposto por Cohen e colaboradores, já na década de 70.¹¹⁸

Todos estes avanços científicos das décadas de 70 e 80 contribuíram para evidenciar a importância da inflamação na fisiopatologia da asma.

Nos anos 70, Samuelsson e colaboradores descreveram e identificaram os leucotrienos e as prostaglandinas¹¹⁹ a partir da cascata do ácido araquidónico.¹²⁰⁻¹²³

Foram identificados outros mediadores libertados pelos linfócitos, tendo sido decidido no II *Workshop* sobre linfocinas na Suíça, em 1979, a sua designação como interleucinas, que seriam numeradas sequencialmente à medida que fossem descobertas. Registe-se que na altura só eram conhecidas a IL-1 e a IL-2.

No final dos anos 80 foi documentada a existência de duas subpopulações linfocitárias T helper: Th₁ e Th₂.¹²⁴⁻¹²⁶

O reconhecimento do papel da inflamação, com os avanços do conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da asma, permitiu o estabelecimento de uma definição operacional proposta pela NHLBI/WHO no *Workshop* realizado na década de 90 dedicado à “Estratégia global de abordagem e prevenção da asma”, em que se considera que: “Asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas, na qual muitas células desempenham um papel importante, incluindo os mastócitos, eosinófilos e linfócitos T. Em indivíduos susceptíveis, esta inflamação causa episódios recorrentes de pieira, dificuldade respiratória, aperto torácico e tosse, particularmente à noite e/ou ao despertar. Estes sintomas estão associados a uma obstrução variável das vias aéreas, a qual é geralmente reversível espontaneamente ou após terapêutica. A inflamação também causa um aumento da reactividade das vias aéreas a vários estímulos”.¹²⁷

Desde o final do século XX, os trabalhos de investigação têm realçado o carácter inflamatório da asma. A inflamação encontra-se na base da hipersusceptibilidade brônquica, dependendo a actividade clínica da doença da intensidade da resposta inflamatória.¹²⁷⁻¹²⁹

Pelo exposto e numa perspectiva histórica desde a Antiguidade, progrediu-se de uma noção redutora desta patologia, associada meramente a critérios funcionais, como a presença de broncoespasmo, reversibilidade de obstrução das vias aéreas e hipersusceptibilidade brônquica, para uma visão globalizante em que se encara esta patologia como uma doença inflamatória crónica das vias aéreas.

Uma análise compartimentada desta patologia permitiria analisá-la sob o ponto de vista fisiopatológico como resultante da limitação do fluxo aéreo ou broncoconstricção; sob o ponto de vista anatomopatológico como resultante da inflamação e infiltração celular; sob o ponto de vista clínico como a doença que se traduz por tosse persistente e pieira, especialmente nocturna, na presença de estímulos específicos ou inespecíficos e muitas vezes associada a outras doenças alérgicas; sob o ponto de vista epidemiológico como associada a pieira, porquanto seria um sintoma facilmente inquirido, partindo do pressuposto que a maioria dos asmáticos tem pieira.

A asma brônquica surge então como uma doença crónica, de etiologia multifactorial, que pode atingir indivíduos de qualquer idade. Com elevada prevalência na infância, representa uma das doenças crónicas mais frequentes em idade pediátrica e constitui a principal causa de internamento em crianças com doença crónica.^{130,131} É uma das causas *major* de absentismo escolar e de interferência com a qualidade de vida, bem como com grande impacto socio-económico.^{127,132-134}

Actualmente, a abordagem terapêutica da asma brônquica é suportada pela utilização de fármacos anti-inflamatórios, cuja utilização correcta permite o seu controlo. Estes foram descobertos durante o séc XX, tendo sido claramente abandonadas as opções de outrora, fundamentadas no pressuposto de que a asma se devia exclusivamente a um fenómeno de broncoconstricção.

1.2.2. Epidemiologia da asma brônquica

A prevalência da asma tem vindo a aumentar progressivamente, sobretudo nos países industrializados, verificando-se também um aumento na sua morbilidade. Segundo estudos epidemiológicos internacionais, ronda os 10% na população infantil e 5% na população adulta. Existe uma grande variabilidade desta prevalência por diversos países em todo o mundo, podendo postular-se que esta variação geográfica se deva a uma interacção genética com uma grande variedade de factores tais como dieta, poluição, alérgenos ambientais, infecções e condições domésticas e de qualidade de vida.^{13,132,135-}

137

Em 1991, Robertson e colaboradores reportaram a ocorrência de duplicação da prevalência de pieira em uma ou mais ocasiões, em crianças antes dos 7 anos de idade,

num período de 26 anos.¹³⁸ Em 1994, Peat e colaboradores confirmaram estes resultados ao estudarem crianças entre os 8 e os 10 anos de idade, em duas cidades de Nova Gales do Sul, verificando uma duplicação em 10 anos da prevalência de pieira no ano transacto ao estudo.¹³⁹ O aumento crescente da prevalência de asma começou a ser documentado desde os anos 80 até ao princípio dos anos 90, especialmente em crianças. O aumento da gravidade é validado pelo aumento da taxa de admissão hospitalar por asma.^{13,132} Os dois grandes estudos epidemiológicos internacionais sobre a prevalência de asma, ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) e ECHRS (*European Community Health Respiratory Survey*), diferem na sua génese quanto à metodologia empregue, uma vez que para além de utilizarem diferentes questionários, se destinam a populações diferentes.

O primeiro (ISAAC) tem como população alvo as crianças e o segundo (ECHRS) os adultos. No entanto, ambos inferem da assimetria geográfica da prevalência de asma, menos acentuada no estudo de adultos. Estas variações são atribuíveis a influências ambientais podendo ser inferida a possibilidade da prevenção da asma.

O estudo ECHRS¹⁴⁰ permitiu verificar a existência de alta prevalência de asma no Reino Unido e uma baixa prevalência em países europeus do sul da Europa (Itália e Grécia). Este estudo teve como população alvo adultos entre os 20 e os 44 anos de idade, em 13 centros de 10 países distintos.

A utilização de questionários assentes no sintoma cardinal de asma, a pieira, continua a ser um assunto controverso, uma vez que se reveste de elevada sensibilidade mas pouca especificidade. Porém, as questões referentes à gravidade da asma são específicas. No entanto, variados estudos que comparam os resultados do questionário do ISAAC com outros indicadores, tais como diagnóstico clínico, mostram que a utilização do questionário do ISAAC tem uma sensibilidade e especificidade que é válida para comparação de estudos multicêntricos internacionais.^{141,142}

O projecto ISAAC¹⁴² compreendeu 3 fases distintas. A Fase I (1992-1993) pretendeu estudar a prevalência e a gravidade da asma e outras doenças alérgicas (rinite e eczema atópico) em diferentes populações em todo o mundo através da utilização de questionários. A Fase II (1998-2001) pretendeu estudar a existência de possíveis factores etiológicos, particularmente os sugeridos pelos resultados da fase I, com

avaliação da hipersusceptibilidade brônquica e de atopia (entendendo-se por atopia a tendência pessoal e/ou familiar para produzir anticorpos IgE dirigidos contra alérgenos ambientais comuns).^{143,144} A Fase III (2002-2003) constituiu uma repetição da fase I após uma década, a fim de verificar a evolução na prevalência destas patologias. Este projecto teve início na Alemanha e na Nova Zelândia, tendo posteriormente ganho adeptos a nível mundial.^{141,142}

Este estudo multicêntrico pretendeu estudar a prevalência de doenças alérgicas tais como asma, rinite e eczema em duas faixas etárias distintas: 6-7 anos e 13-14 anos, através da utilização de questionários e vídeos. No caso da faixa etária inferior, os questionários foram respondidos pelos pais e não pelos próprios, como sucedeu nos mais velhos. Os questionários foram traduzidos de inglês para a língua mãe de cada país estudado, num total de 41 línguas diferentes, sendo as mais utilizadas o inglês (32%), o espanhol (15%), o italiano (9%), o chinês (6%) e o português (6%).^{141,142}

O questionário deste estudo compreende questões referentes a prevalência de asma, bem como à sua gravidade, no que diz respeito a sintomatologia durante o último ano e número de crises e a alterações do sono e do discurso.^{141,142}

Na primeira fase do estudo ISAAC, foram analisados 156 centros colaboradores num total de 56 países, com um total de 721.601 crianças estudadas. No grupo 13-14 anos, 155 centros de 56 países participaram, com um total de 463.801 crianças e no grupo 6-7 anos participaram 91 centros de 38 países com um total de 257.800 crianças.^{141,142}

As prevalências mais elevadas de asma foram encontradas na Grã-Bretanha, na Nova Zelândia e na Austrália e as mais baixas na Europa Oriental, China e Indonésia. No nosso país ocorreram variações entre 8 e 11%, tendo sido registado o valor mais elevado na região de Lisboa.^{141,142,145}

Na terceira fase deste estudo foram analisados 106 centros colaboradores num total de 56 países, com um total de 498.083 crianças estudadas. No grupo 13-14 anos, foram incluídos 106 centros de 56 países, com um total de 304.679 crianças e no grupo 6-7 anos participaram 66 centros de 37 países com um total de 193.404 crianças.¹⁴⁶

Em termos globais verificou-se um aumento da prevalência de todas as doenças alérgicas, registando-se no entanto uma estabilização da prevalência de asma nas

crianças dos 13-14 anos, nos países que na fase I apresentavam maior prevalência desta doença.¹⁴⁶

Em Portugal, foram encontrados valores de prevalência de asma (diagnóstico médico), no grupo etário dos 6-7 anos de idade de 11% (fase I) e 9,4% (fase III) e no grupo etário dos 13-14 anos de 11,8% (fase I) e 14,7% (fase III).¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Quanto ao sintoma de pieira nos últimos 12 meses registaram-se no grupo etário dos 6-7 anos de idade 12,9% (fase I e fase III) e no grupo etário dos 13-14 anos 9,2% (fase I) e 11,8% (fase III).¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Na comparação dos resultados do ISAAC obtidos na fase I e na fase III a nível nacional verificou-se que no grupo etário dos 13-14 anos houve um aumento significativo do diagnóstico de asma e de queixas de pieira no último ano.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ No grupo dos 6-7 anos cujos questionários foram preenchidos pelos pais, não se verificou um aumento de prevalência da asma.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Analisando os resultados obtidos referentes à relação entre a prevalência e gravidade (número de crises, perturbação do sono e da linguagem), conclui-se que não existe uma alteração importante do número de casos graves com o aumento da prevalência de asma.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

A análise por cada um dos centros nacionais envolvidos evidenciou que os maiores incrementos da prevalência de asma verificaram-se nas cidades portuguesas com maior população: Lisboa e Porto.¹⁴⁷

1.3. Conceitos sobre a relação entre o sistema imune e asma

1.3.1. Generalidades sobre o sistema imune

O Sistema Imune encontra-se vocacionado para a resposta à agressão microbiológica, através de diversos mecanismos e células especializadas.

Um determinado antigénio tem inicialmente que transpor um conjunto de barreiras anatómicas e fisiológicas que constituem a primeira linha de defesa do organismo. É então desencadeada uma resposta que se encontra a cargo de células do sistema imune

inato (granulócitos, mastócitos) e de um conjunto de proteínas que orquestram a defesa inicial (sistema do complemento, cininas, cascata do ácido araquidónico).

Os antígenos são processados pelas células apresentadoras de antígeno (APC), em que se destaca o papel da célula dendrítica, apresentadora de antígeno por excelência. Esta apresenta constitutivamente na sua superfície moléculas fundamentais para a interacção com a célula T, iniciando-se a resposta do sistema imune adaptativo, com a posterior comunicação com o linfócito B, da qual resulta a produção de anticorpos (imunoglobulinas).

Torna-se no entanto fundamental a existência de mecanismos que impeçam a resposta imune dirigida contra o próprio indivíduo ou contra antígenos inócuos, que se designam por mecanismos de tolerância imunológica.

A tolerância imunológica pode ser definida como a ausência de resposta a determinadas moléculas e pode surgir através de dois mecanismos: um mecanismo central, que ocorre durante a ontogenia das células T e que leva à eliminação das células T auto-reactivas por deleção clonal no timo; e um conjunto de mecanismos periféricos, que se desenvolvem ao longo da vida de um indivíduo e que controlam as respostas contra antígenos inócuos ou reconhecidos com baixa afinidade. As células reguladoras mantêm a tolerância periférica.¹⁴⁹ Diversas doenças podem surgir pela inexistência deste controlo eficaz, tais como as doenças auto-imunes e doenças alérgicas.

Para compreender a possível importância da relação entre células reguladoras e alergia será importante compreender os mecanismos imunológicos envolvidos nas doenças alérgicas.

1.3.2. O conceito de alergia

Segundo a nomenclatura da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (EAACI), as reacções de hipersensibilidade podem ser alérgicas (com envolvimento de mecanismos imunológicos) ou não alérgicas (sem envolvimento de mecanismos imunológicos; ex. intolerância à lactose por défice de lactase).^{143,144}

As doenças alérgicas podem envolver a produção de imunoglobulina E (IgE) ou não (envolvendo outros anticorpos ou células, como por exemplo a doença celíaca, em que participam linfócitos e ocorre produção de imunoglobulina A - IgA antigliadina).^{143,144}

Na resposta alérgica mediada por IgE ocorre um contacto entre o alergénio e duas moléculas de IgE que se encontram à superfície do mastócito ou do basófilo. Esta ligação conduz à desgranulação destas células com libertação de mediadores inflamatórios (histamina, prostaglandinas, bradicinina, leucotrienos).

Esta resposta pressupõe o contacto prévio desse alergénio com o sistema imune, com a produção de IgE específica, que se encontrará em circulação e nos tecidos, ligada a células efectoras que tenham receptores para a IgE (ex. mastócito, basófilo) – **sensibilização alérgica**.

Os alergénios podem ter várias origens (alimentos, medicamentos, ambiente), designando-se por atopia a tendência pessoal e/ou familiar para produzir anticorpos IgE dirigidos contra aeroalergénios comuns.^{143,144}

1.3.3. A resposta imune alérgica

Na década de 80 foram definidos dois subgrupos funcionalmente distintos de linfócitos T CD4⁺ que se distinguem entre si por diferentes padrões de produção de citocinas e pela promoção de respostas efectoras distintas: as células Th₁ produtoras de IFN- γ , IL-12, TNF- α e as células Th₂ produtoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.¹⁵⁰⁻¹⁵⁴

A diferenciação da célula T em subpopulações Th₁ e Th₂ depende da activação de genes e factores de transcrição específicos para a linhagem Th₁ (STAT-4/T *bet*) ou Th₂ (STAT-6/GATA-3), que serão activados após o contacto antigénico com a célula T virgem ou *naive*.^{150,151}

A activação das células Th₂ tem um papel major na inflamação alérgica, uma vez que estes linfócitos estimulam a síntese de IgE pela célula B, pela produção de IL-4 e IL-13, bem como o posterior recrutamento eosinofílico através da produção de IL-5, condicionando a hipersusceptibilidade brônquica, no caso da asma.¹⁵²⁻¹⁵⁴

A IL-4, IL-5 e IL-9 aumentam a sobrevivência dos eosinófilos e dos seus progenitores. A IL-9 constitui um factor de crescimento para os mastócitos e a IL-13 tem vindo a ser associada a hiperplasia das células mucosas, hipersecreção de muco e hipersusceptibilidade brônquica.¹⁵⁵

Os indivíduos atópicos, ao contrário dos não atópicos, apresentam um padrão citocínico de predomínio Th₂ com produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-31.¹⁵⁶⁻¹⁶¹ São detectados níveis elevados de citocinas do tipo Th₂ em locais de inflamação alérgica e na sequência de provas de provocação com alérgenos nestes indivíduos.^{162,163}

A asma alérgica caracteriza-se pelo envolvimento do sistema imune com uma exacerbação da resposta Th₂ dirigida para alérgenos ambientais e traduzida por uma inflamação das vias aéreas.¹⁶⁰

Refira-se no entanto que se tem tornado particularmente evidente nos últimos anos que as interações entre as subpopulações celulares T e respectivas citocinas são muito complexas e dependem de vários factores tais como idade, sexo e tipo de estímulo.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶

De facto, Uekert e colaboradores documentaram num estudo prospectivo desde o nascimento que as crianças do sexo masculino apresentavam uma maior sensibilização alérgica, um aumento da produção de IL-5, IL-13 e IFN- γ , bem como valores mais elevados de IgE total em relação às crianças do sexo feminino, que podiam preceder ou surgir concomitantemente ao aparecimento de doenças alérgicas.¹⁶⁶

1.3.4. Hipótese higiénica

A existência de um padrão Th₂ dirigida nos indivíduos com doenças alérgicas poderia ser explicitado à luz da teoria higiénica que postula que a ausência de contacto com microorganismos, bem como a utilização de antibióticos, melhoria das condições sanitárias e protecção ambiental, particularmente no primeiro ano de vida, impede a ocorrência do desvio imune de Th₂ para Th₁, como seria de esperar no indivíduo saudável, com o aumento da idade.^{155,167-170}

Nos doentes expostos a microorganismos, ocorre estimulação crónica dos receptores *Toll-like* expressos nas células do sistema imune inato pela exposição a endotoxinas.¹⁷¹

A redução da estimulação dos receptores *Toll-like* das células dendríticas e células *Natural Killer* resulta numa diminuição da produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ o que, para além de não promover o desenvolvimento de células Th₁ antagoniza também o desenvolvimento de células Th₂.¹⁷²

No entanto, sabe-se actualmente que as células Th₁, são pró-inflamatórias e que o desenvolvimento de uma resposta Th₁ pode exacerbar a asma e outras doenças alérgicas.¹⁷³

Foram realizados estudos nos quais foram transferidas células Th₁ específicas de alérgico para os pulmões de ratinhos saudáveis, constatando-se um aumento da inflamação das vias aéreas, apesar de não se ter verificado indução directa da hipersusceptibilidade brônquica.¹⁷⁴

O aumento da prevalência de doenças alérgicas nos últimos 20 anos foi acompanhado de um aumento da prevalência de doenças auto-imunes, nomeadamente diabetes tipo 1 e esclerose múltipla.¹⁷⁵ Estas observações sugerem que as alterações ambientais que provocaram o aumento da prevalência da asma e de outras doenças alérgicas, não podem ser explicadas apenas com base na redução do perfil Th₁.¹⁷⁵

Mais recentemente, admite-se que esta resposta imunitária possa surgir pela falência de diferentes mecanismos de supressão da resposta Th₂ pelos linfócitos T reguladores.^{176,177}

A hipótese que atribui o aumento da prevalência de alergias à diminuição da actividade das células T reguladoras dada a ausência de estimulação bacteriana, parece ser corroborada por alguns estudos epidemiológicos que demonstraram a redução de alergias em crianças infestadas por parasitas,¹⁷⁸ bem como o aumento concomitante já referido da prevalência de doenças auto-imunes e de alergias nos países desenvolvidos.¹⁷⁵

O reconhecimento de antígenos externos é primariamente efectuado pelas células dendríticas, cuja função se encontra sub-otimizada nos lactentes e crianças mais novas, uma vez que apenas maturam mais tarde na vida.

Há células dendríticas derivadas da medula que maturam e expressam antígeno e têm capacidade para activar células T reguladoras.^{179,180}

Na periferia, quando as células dendríticas maduras apresentam antígenos do próprio (*cognate antigens*, ou capazes de se ligarem ao complexo major de histocompatibilidade ou *major histocompatibility complex* - MHC) às células T reguladoras, será de esperar que estas células possam proliferar em resposta a esta apresentação e como tal manter a tolerância aos auto-antígenos suprimindo a resposta T.^{181,182}

As células dendríticas maduras expandem a população de células reguladoras T a partir de um mecanismo dependente das moléculas CD80/86.^{181,183}

Para a indução de células T reguladoras naturais tem que ocorrer contacto célula a célula (célula dendrítica-célula T), o que torna este tipo de supressão restrita ao MHC e específica de antígeno. Há várias moléculas expressas pelas células dendríticas que são candidatas a mediar sinais de indução para as T reguladoras. De entre essas moléculas podemos ter a IL-10, PD-L1 (ligando de morte programada ou *programmed death-ligand 1*) e IDO (indolamina 2,3 dioxigenase).^{184,185}

A modulação das moléculas de co-estimulação nas células dendríticas é também uma via de indução de células T reguladoras, sendo neste caso as moléculas da família B7 (1 e 2) ou a de CTLA-4 aquelas que têm sido alvo de maior investigação.¹⁸⁶

As células dendríticas são também responsáveis pela diferenciação das células T virgem ou *naive* em células reguladoras naturais, mediante a expressão de moléculas co-estimuladoras e pela produção de citocinas, nas quais se destacam a IL-2 e TGF- β .^{187,188}

Por outro lado, tem vindo a ser demonstrado que a estimulação repetida de células T *naive* por células dendríticas imaturas induz a produção de células T reguladoras adaptativas *in vitro*.¹⁸⁹

Existem também células dendríticas tolerogénicas que podem ser induzidas por agentes farmacológicos ou biológicos (IL-10, TGF- β ,¹⁹⁰ *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus Casei*,¹⁹¹ *Serratea*¹⁹² ou proteínas endógenas como a cadeia pesada da ferritina¹⁹³) e que induzem o *priming* de células reguladoras adaptativas.¹⁹⁴

Por fim, saliente-se que as células dendríticas tratadas com fármacos com actividade imunossupressora, tais como a vitamina D3 e/ou a dexametasona, induzem o *priming* das células T que se tornam anérgicas e supressoras.^{195,196}

1.3.5. Populações de células reguladoras

As células T reguladoras têm a capacidade de inibir *in vivo* e *in vitro* as respostas da célula T, podendo impedir o desenvolvimento de doenças auto-imunes.¹⁹⁷

Com base em modelos animais, foram propostos dois subgrupos de células T reguladoras, que diferem entre si em termos de especificidade e do mecanismo efector: as **células naturais ou profissionais** (CD4⁺CD25⁺), que representam 5 a 10% das células T CD4,¹⁹⁸⁻²⁰⁰ desenvolvem-se no timo²⁰¹⁻²⁰³ e dão origem a uma população periférica de células T específicas para auto-antígenos (antígenos do “self”) com capacidade de regular especificamente as respostas auto-imunitárias e as **células adaptativas ou induzidas** (Tr1, Th3 e outras), que também provêm do timo, mas adquirem a sua actividade supressora na periferia, na sequência da activação de linfócitos T maduros, em condições sub-óptimas de exposição antigénica,^{198,204,205} encontrando-se vocacionadas para a resposta a auto antígenos e a antígenos exteriores (“não self”).¹⁹⁸ As células T helper tipo 3 (Th3) podem ser induzidas pela administração oral de antígeno²⁰⁶ e as células T reguladoras 1 (Tr1) são induzidas pela administração de antígeno na presença de IL-10.²⁰⁷

As células reguladoras naturais e adaptativas são específicas de antígeno, embora o seu mecanismo de acção seja inespecífico e dependente ou de contacto célula a célula ou da produção de citocinas supressoras.¹⁷² De facto, as células Th3 dependem da presença de TGF-β²⁰⁶ e as células Tr1 de IL-10.²⁰⁷

Na população linfocitária de células T reguladoras CD4⁺ estão incluídas as células CD25⁺, as células T reguladoras do tipo 1 (Tr1) e as células Th3. Outras populações celulares como as células CD8⁺CD28⁻,^{208,209} células NK, células CD4⁺CD8⁻ e células B têm sido implicadas em mecanismos de regulação.^{210,211} As primeiras podem mesmo comportar-se como células reguladoras naturais.²⁰⁹

Células reguladoras naturais CD4⁺CD25⁺

As células CD4⁺CD25⁺ foram descritas em 1995 por Sakaguchi e colaboradores¹⁹⁷ como uma pequena fracção (aproximadamente 10%) de células T CD4⁺ que desempenham um papel importante na prevenção da auto-imunidade, na rejeição de aloenxertos e na manutenção da auto-tolerância.¹⁷⁴

A população de células CD4⁺CD25⁺ tem sido investigada em vários estudos, documentando-se a sua presença na maioria dos indivíduos saudáveis e apresentando um papel preponderante na regulação da resposta imunitária inata e adquirida. Esta subpopulação de linfócitos T CD4⁺ expressa constitutivamente a cadeia α do receptor da IL-2 (CD25)^{197,212,213} e tem um papel preponderante na manutenção da tolerância periférica,^{202,213,214} prevenindo a proliferação de células T auto-reactivas que tenham escapado ao processo de tolerância central por deleção no timo.²¹⁵ Tem ainda uma acção moduladora da actividade das células dendríticas²¹⁶ pela sua possível acção citotóxica por intermédio de perforinas²¹⁷ e regula as respostas Th₁ e Th₂.²¹⁸

Estas células são anérgicas e não proliferam mediante activação via TCR, excepto na presença de IL-2 ou de IL-5. De facto, a IL-2 é necessária para desencadear a sua função supressora.¹⁴⁹ Suprimem a proliferação e produção de IFN- γ por parte dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Os mecanismos reguladores das células CD4⁺CD25⁺ incluem a supressão por mecanismos de contacto célula a célula,^{213,219} que envolvem as moléculas CTLA-4^{212,220,221} e TGF- β 1, levando a uma diminuição da expressão da cadeia α do receptor da IL-2 nas células T alvo.²⁰⁴

A sinalização via TGF- β nas células CD4⁺CD25⁺ é importante para a actividade supressora, expansão e activação destas células.²²²

Deste modo, a actividade supressora depende de mecanismos de contacto celular dependente da interacção MHCII/TCR via reconhecimento específico de antigénio.^{223,224} Por outro lado, tem sido proposto um eventual papel do receptor para o TNF (GITR) como mecanismo de supressão celular.^{212,224-226}

A activação das células $CD4^+CD25^+$ é dependente das células dendríticas, que expressam durante o seu processo de maturação receptores de superfície CD80/CD86 e que se revelam de importância maior para activação celular, devido ao seu papel de co-estimulação, sem o qual as células ficam anérgicas.^{223,227}

Estes receptores têm acções opostas, condicionando a expressão de CD80 o aumento da actividade supressora e a expressão de CD86 o efeito oposto.²²³ O aumento do número de células T reguladoras está associado ao aumento de expressão do factor de transcrição Foxp3 e de $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$, encontrando-se o CTLA-4 envolvido na actividade reguladora. Este último regula a função das células $CD4^+CD25^+$ durante o desenvolvimento inicial e posteriormente na sua fase efectora, onde a sua presença se reveste da maior importância para a actividade supressora.^{228,229}

Outro receptor importante para a co-estimulação é o 4-1BB, conhecido pela sua capacidade de promover a proliferação e a sobrevivência das células $CD8^+$, tendo sido demonstrada a sua importância para a proliferação das células $CD4^+CD25^+T$ *in vitro* e *in vivo*, com inibição da sua actividade supressora.²²³

A diferenciação da célula $TCD4^+$ em célula reguladora, em detrimento de efectora/memória, pode ainda depender da expressão de outras moléculas tais como LAG-3 e neuropilina-1.

O LAG-3 é uma molécula associada a células CD4 que se liga ao MHC II modulando a actividade supressora das células $CD4^+CD25^+$, sendo a sua produção ectópica suficiente para conferir actividade reguladora.²³⁰

A neuropilina 1 é um receptor envolvido na maturação axonal, angiogénese e activação da célula T, encontrando-se expressa constitutivamente na superfície das células $CD4^+CD25^+$, independentemente do seu estado de activação, estando a sua presença directamente relacionada com a actividade supressora destas células.²³¹ No entanto, também pode ser expressa noutras células.

A família dos factores de activação nuclear da célula T (NFAT) compreende 4 membros: NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 e uma proteína distante relacionada NFAT5. Os tipos 2 e 3 estão envolvidos no processo de supressão das células T

CD4⁺CD25⁺. Nos ratinhos deficientes de NFATc2 e NFATc3 surgem síndromes linfoproliferativas, mesmo na presença de células funcionalmente activas.²³²

Nos humanos apenas 2% das células TCD4⁺, designadas CD4⁺CD25^{forte}, têm uma função verdadeiramente reguladora,²³³ apresentando-se funcionalmente muito semelhantes às células CD4⁺CD25⁺ e surgindo *in vivo* a partir de células T de memória e *in vitro* a partir de células CD4⁺CD25⁻.²³⁴

No entanto, um estudo efectuado por Jartti e colaboradores visando avaliar esta população de células em crianças com alto risco de atopia concluiu que a população de células CD4⁺CD25^{forte} seria uma mistura de células reguladoras e células activadas.²³⁵ De facto, tem vindo a ser postulado nos últimos anos que a expressão de CD25 seria diferente nas células T reguladoras (CD4⁺CD25^{forte}) e nas células T activadas/efectoras (CD4⁺CD25^{fraco}), permitindo facilmente identificar a população de células reguladoras.²³⁶ A existência de células T com densidade intermédia (CD4⁺CD25^{int}) torna muito difícil o isolamento de populações puras de células reguladoras em sangue periférico.¹⁷²

Em trabalhos mais recentes foi documentado que a inexistência do factor de transcrição Foxp3 nos ratinhos murganhos condicionava a ocorrência de uma doença auto-imune mortal, caracterizada pela deficiência das células CD4⁺CD25⁺, que não ocorria no caso de se transferir esta população celular para ratinhos Foxp3⁻, postulando-se a importância major deste factor para a sua existência.^{237,238}

O factor de transcrição Foxp3 tem sido reconhecido como um marcador intracelular das células T reguladoras.^{237,239,240} É constitutivamente expresso em altos índices^{241,242} nas células T reguladoras, sendo essencial para o seu desenvolvimento e actividade reguladora.^{149,237}

A presença de TGF-β constitui um elemento chave para a expressão de Foxp3 e activação dos precursores CD4⁺CD25⁺ com fenótipo de actividade supressora.²⁴³

Por outro lado, a expressão de Foxp3 encontra-se diminuída na presença de TNF-α, que suprime a actividade reguladora das células reguladoras naturais via receptor 2 da TNF-α (TNFR2).²⁴⁴

Recentemente foram desenvolvidos um conjunto de anticorpos monoclonais com especificidade Foxp3, aplicáveis a técnicas de citometria e imunohistoquímica,²⁴⁵ que permitiram verificar que apesar de a maioria das células CD4⁺CD25^{forte} e de menos de metade das células CD4⁺CD25^{int} expressarem Foxp3 no sangue periférico, esta molécula não é específica destas células podendo também ser expressa em células CD4⁺ e CD8⁺.²⁴⁶

A expressão de mRNA de Foxp3 pode também ser induzida em células mononucleares de sangue periférico, indicando tratar-se de um marcador de activação celular.²⁴⁶

Foi sugerido que a expressão de Foxp3 pode estar aumentada em células CD4⁺CD25⁻ e que esta situação estaria relacionada com a aquisição de função reguladora por parte das mesmas.²⁴⁷

A expressão ectópica de Foxp3 em linfócitos T CD4⁺ não reguladores converte estas células em linfócitos T reguladores que, em ratos, inibiram o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas, colite e gastrite.^{237,239,248}

As células dendríticas maduras expandem a população de células reguladoras T Foxp3⁺ dependente das moléculas CD80/86.^{181,183} Após estimulação as células T *naive* podem diferenciar-se em células T reguladoras Foxp3⁺ na presença de TGF-β ou em células Th17 produtoras de IL-17 na presença de TGF-β e IL-6.^{187,249} A presença de IL-2 facilita a diferenciação da célula T *naive* em célula reguladora mas inibe a diferenciação em célula Th17.¹⁸⁸

Pelo exposto se infere que os linfócitos T activados também expressam Foxp3, GITR, CD25 e CTLA-4, na sua superfície.^{212,225,245}

Células reguladoras adaptativas

Th3

As células Th3 foram descritas em 1994 por Chen e colaboradores como células T CD4⁺ que eram induzidas nos gânglios linfáticos mesentéricos após estimulação com antígenos administrados por via oral. Produzem TGF-β, IL-4 e IL-10.²⁰⁶

A presença de TGF- β ajuda a induzir a diferenciação de linfócitos T *naive* em células Th3. Apesar da IL-4 promover o desenvolvimento de células Th3, não é fundamental para este processo. A IL-10 pode aumentar a expansão de células Th3 ao reduzir o desenvolvimento e maturação de células de perfil Th₁.²⁵⁰

Estas células têm capacidade de suprimir o desenvolvimento da encefalomielite auto-imune experimental, o que sugere que o TGF- β e a IL-10 produzidos inibem os efeitos das células T auto-reactivas.¹⁷⁴

Tal como as células T reguladoras naturais ou profissionais, estas células expressam CTLA-4 na sua superfície. Usualmente não expressam Foxp3,²⁵¹ embora se encontre descrita a possibilidade da expressão de Foxp3 e de CD25 após re-estimulação das células Th3.²³⁹ Ao contrário das células T reguladoras naturais, o mecanismo supressor essencial destas células não depende do contacto celular mas sim da produção de TGF- β , que suprime a proliferação de células Th₁ e Th₂.²⁵² As células Th3 também estimulam os plasmócitos a secretar IgA.²⁵³

Tr1

Em 1997, Groux e colaboradores demonstraram que a activação crónica das células T CD4⁺, na presença de IL-10 exógena, dava origem a células Tr1, a partir de linfócitos T *naive*.²⁵⁴ Até à data não foi descrito nenhum marcador de superfície específico, pelo que as células Tr1 são identificadas com base no seu padrão de produção de citocinas. Estas células têm uma baixa capacidade proliferativa e produzem níveis elevados de IL-10,^{194,255} níveis consideráveis de IFN- γ , TGF- β e IL-5, níveis baixos de IL-2, não produzindo IL-4.^{194,250} Através da produção de IL-10 e de TGF- β , as células Tr1 suprimem as respostas de células T primárias e secundárias, ou seja, suprimem a proliferação de células T CD4⁺ em resposta a antigénios.¹⁸⁹

As células T reguladoras induzidas por fármacos imunossupressores²⁵⁶ ou por antigénios²⁵⁷ produzem IL-10 mas não IL-5 ou IFN- γ . Esta observação levanta a questão sobre a origem das células T reguladoras produtoras de IL-10, se são geradas directamente a partir das células T *naive* ou se resultam de células Th₁ ou Th₂ submetidas a estimulação crónica, o que levaria ao desaparecimento das citocinas efectoras com manutenção dos níveis de IL-10.

As células Tr1 específicas para vários tipos de antígenos, incluindo auto-antígenos, podem ser encontradas especialmente na mucosa intestinal e está demonstrado que evitam a indução experimental de colite em ratos com imunodeficiência combinada grave.¹⁷⁴ Podem ser induzidas na periferia por células dendríticas tolerogénicas.

Fenotipicamente, as células Tr1 são semelhantes às células T reguladoras naturais, uma vez que ambas expressam CTLA-4.²⁵⁸ Em contraste com as células T reguladoras naturais, as células Tr1 não expressam níveis elevados de CD25 ou de Foxp3, nem exercem o seu efeito supressivo através de contacto célula a célula.^{205,251,259}

Estas células diminuem a inflamação pulmonar na asma através da produção de IL-10.²⁶⁰

Th1^{reg}

Estas células são induzidas pela activação das células T por células dendríticas CD8 α^+ , expressam CD25 e Foxp3 e produzem IL-10 e IFN- γ , estando documentada a sua importância na protecção do aparecimento de hipersusceptibilidade brônquica.²⁶¹

Natural Killer

As células NK podem afectar a diferenciação das células Th₂. São responsáveis pela produção de grandes quantidades de citocinas (IL-4 e IFN- γ) quando activadas por antígenos glicolípidicos do próprio.²⁰²

As NK estão presentes no pulmão e produzem níveis elevados de IL-4 e IL-13, que regulam o aparecimento de hipersusceptibilidade brônquica.

Foi demonstrado em 2003 por Wilson e colaboradores que estas células têm actividade reguladora em doenças auto-imunes, incluindo a diabetes mellitus tipo 1, a encefalomielite auto-imune experimental, a colite induzida por oxazolona e na imunidade tumoral.¹⁷⁴ Após a sua activação, as células NK produzem grandes

quantidades de IL-4 e de IFN- γ , que estão relacionados com a sua actividade reguladora.

1.3.6. Papel das células reguladoras na asma e doenças alérgicas

As células T reguladoras têm sido estudadas principalmente no contexto de tolerância a auto-antígenos e doenças auto-imunes. No entanto, a tolerância imunológica também é importante em termos da resposta imunitária a antígenos encontrados nos tractos respiratório e gastrointestinal. Estes locais estão continuamente expostos a uma grande variedade de antígenos que induzem tolerância ou hipersusceptibilidade. Esta tolerância a antígenos ambientais poderia ser mediada pelo desenvolvimento de células T reguladoras ou por deleção clonal e anergia das células específicas para o alérgeno.

Várias linhas de investigação independentes indicam que a função das células T reguladoras está alterada em doentes com doença alérgica, quando comparados com indivíduos saudáveis.

Na hipótese higiénica sugere-se que, nos primeiros meses de vida, uma alteração na indução das células T reguladoras naturais e/ou das células Th₁ contribui para um aumento da incidência de doenças alérgicas.²⁶²

Verificou-se que doentes com IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy, X linked syndrome*), nos quais se verifica uma ausência de células reguladoras CD25⁺, provocada por uma mutação rara no gene que codifica o factor de transcrição Foxp3, desenvolvem eczema grave, aumento dos níveis de IgE, eosinofilia e alergia alimentar, pelo que é provável que as células T reguladoras possam, de alguma forma, controlar o desenvolvimento de asma e de outras doenças alérgicas.²⁶³

Esta teoria pode ser corroborada por estudos que demonstraram que as células T produtoras de TGF- β reduzem, de uma forma eficaz, a inflamação e a hipersusceptibilidade das vias aéreas.¹⁷⁶

A inflamação das vias aéreas em doentes asmáticos também pode ser inibida por linfócitos T produtores de IL-10. Assim a transferência de células T secretoras de IL-10 inibiu a inflamação das vias aéreas e da hipersusceptibilidade brônquica induzidas pela

transferência prévia de células Th₂.¹⁷⁷ Estes estudos sugerem que as células T reguladoras produtoras de IL-10 têm um efeito inibidor directo sobre as células Th₂.

A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória e imunossupressora, inibindo a produção de citocinas pelos macrófagos e células dendríticas e conduzindo a uma supressão da resposta Th₁.²⁶⁴ Por outro lado também conduz a uma inibição Th₂ e da actividade dos mastócitos e eosinófilos com modulação do *ratio* IgG4/IgE.^{264,265} Parece haver uma correlação inversa entre os níveis de IL-10 e a incidência e/ou gravidade de asma e doenças alérgicas, com níveis de IL-10 no lavado bronco-alveolar inferiores nos asmáticos em relação ao grupo controlo, bem como uma menor produção de mRNA para IL-10.^{266,267} Num estudo efectuado por Matsumoto e colaboradores, o número de células T CD4⁺ circulantes produtoras de IL-10 encontrava-se diminuído nos doentes com asma grave instável, em comparação com os doentes com asma grave estável e os doentes com asma moderada.²⁶⁸

A IL-10 parece ser uma importante candidata para o tratamento da alergia e da asma, embora tenha uma curta semi-vida *in vivo*.²⁶⁹

Foi sugerido que a exposição a alérgenos respiratórios poderia levar ao desenvolvimento de tolerância e à formação de células T reguladoras e que as células Th₂ surgiriam como formas aberrantes do desenvolvimento das primeiras, provavelmente por produção inadequada de IL-10 ou por aumento da produção de IL-4 e de IL-13, levando ao aparecimento das doenças alérgicas.²⁷⁰

Um estudo recente também indica que a ocorrência de doença alérgica reflecte um desequilíbrio entre as células T reguladoras produtoras de IL-10 e as células Th₂, demonstrando a existência de um aumento de células T secretoras de IL-4 específicas de antígeno em indivíduos atópicos e um aumento de células T secretoras de IL-10 específicas de antígeno em dadores não atópicos.²⁷¹

Três estudos independentes demonstraram que as células T reguladoras de indivíduos atópicos^{218,272} inibem a resposta Th₂ de uma forma pouco eficaz.

A indução de tolerância oral para determinados alimentos está associada ao aumento da população de células CD4⁺CD25⁺, quer no animal, quer no humano.^{270,273}

Num estudo efectuado em crianças com alergia às proteínas de leite de vaca ficou demonstrado que ocorria um aumento da população de células CD4⁺CD25⁺ no sangue periférico das crianças que começaram a tolerar leite na dieta, ao contrário das que permaneciam clinicamente sintomáticas.²⁷³

Em crianças com alergia ao amendoim, foi documentado o aumento de IFN- γ específico de antígeno e redução de IL-4 nas crianças que passaram a tolerar a sua ingestão, em comparação com as crianças que permaneceram sintomáticas, sugerindo a ocorrência de um desvio Th₂ para Th₁, nas crianças que atingiram tolerância.²⁷⁴

Em doentes com eczema atópico, ocorre um aumento significativo da população de células CD4⁺CD25⁺ no sangue periférico, com actividade imunossupressora normal. No entanto, após estimulação com superantígenos perdem a sua actividade imunossupressora, sugerindo um mecanismo explicativo para o aumento da activação celular T em doentes com esta patologia.²⁷⁵

Ling e colaboradores demonstraram que as células CD4⁺CD25⁺ de dadores não atópicos suprimiam a proliferação e a produção de IL-5 pelas células CD4⁺CD25⁺ T, estimuladas com um alérgeno, do próprio indivíduo atópico, não se verificando esta supressão no caso de o dador ser atópico.²¹⁸

Outro estudo conseguiu comprovar que durante a época polínica da bétula, as células CD4⁺CD25⁺ dos indivíduos alérgicos à bétula eram deficitárias na redução da produção de IL-13 e IL-5 mas não na capacidade de reduzir a produção de IFN- γ .²⁷⁶

Estes estudos podem sugerir que a doença alérgica surge pela activação alérgica das células CD4⁺CD25⁺ e das células efectoras Th₂, talvez por uma deficiência na função supressora das primeiras ou pela ocorrência de fortes sinais de activação. Deste modo, o tratamento e prevenção das doenças alérgicas pode passar pela activação e diferenciação das células reguladoras e supressão das células Th₂.

Neste sentido foi efectuado um estudo com crianças asmáticas e um grupo controlo, em que se comprovou que os níveis de sIL-6R estavam aumentados nas vias aéreas dos primeiros. Mais ainda, o bloqueio de sIL-6R num modelo murino conduziu ao decréscimo de células Th₂ no pulmão e aumento da expressão local de células

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, com capacidade imunossupressora, postulando-se que a administração destas células possa ser uma arma terapêutica para os asmáticos.²⁷⁷

Jaffar e colaboradores demonstraram que a população de células CD4⁺CD25⁺ inibe a inflamação eosinofílica através da modulação do fenótipo Th₂, não tendo qualquer influência ao nível da hipersusceptibilidade brônquica.²⁷⁸

Alguns estudos demonstraram que as células CD4⁺CD25⁺ modulam a resposta Th₁ e Th₂ e podem suprimir a maturação Th₂.^{278,279}

Num estudo efectuado por Shi e colaboradores verificou-se que a população de células CD4⁺CD25⁺ circulantes não diferia entre controlos saudáveis, atópicos não asmáticos e asmáticos, verificando-se no entanto, um aumento destas nos asmáticos durante uma exacerbação clínica.²⁸⁰

Haddeland e colaboradores estudaram o sangue do cordão de um grupo de recém-nascidos com história familiar de alergia e de um grupo controlo concluindo que os primeiros apresentavam um défice das populações CD25⁺ e CD25^{forte}.²⁸¹

Mais recentemente tem sido estudada a população de células CD4⁺CD25^{forte}, existindo estudos que documentam a existência de um decréscimo quantitativo e funcional desta população no lavado bronco-alveolar de crianças com asma brônquica em relação ao grupo controlo, verificando-se ainda que crianças tratadas com corticosteróides inalados apresentavam valores superiores aos das crianças não tratadas.²⁸² Refira-se ainda que não foram encontradas diferenças na avaliação de asmáticos e grupo controlo na quantificação de CD4⁺CD25^{forte} no sangue periférico, encontrando-se valores inferiores nas crianças asmáticas não tratadas com corticosteróides inalados em relação às crianças tratadas, bem como o aumento da expressão de mRNA Foxp3 nas tratadas.²⁸²

Do mesmo modo, num estudo efectuado por Hoffmann e colaboradores não foram documentadas diferenças na população de células CD4⁺CD25^{forte} no sangue periférico entre adultos asmáticos e grupo controlo.²⁸³

Num estudo recente de Lin e colaboradores foi possível demonstrar que a expressão de Foxp3 estava diminuída nos doentes asmáticos em relação ao grupo controlo pelo aumento da produção de TNF- α em células mononucleares periféricas estimuladas com

Dermatophagoides pteronyssinus, embora não existissem diferenças na quantificação da população de células CD4⁺CD25^{forte} no sangue periférico entre os dois grupos.²⁴⁴

Por outro lado, foi demonstrado por alguns estudos que a administração de corticosteróides a doentes asmáticos estimulava funcionalmente as células CD4⁺CD25⁺, o que poderia explicar a melhoria clínica bem como a sua eficácia anti-inflamatória e imunossupressora.²⁸⁴⁻²⁸⁸

Esta estimulação caracterizava-se pela expressão de citocinas supressoras bem como do factor de transcrição Foxp3, que se correlaciona com a presença de IL-10.²⁸⁹

Num estudo efectuado por Schaub e colaboradores documentou-se a expressão de mARN aumentada para IL-10 após cultura de células de cordão com peptidoglicano em recém-nascidos filhos de mães não atópicas em comparação com os filhos de mães atópicas, não se verificando diferenças após estimulação com ácaros do pó. Os autores reportam ainda uma menor expressão de Foxp3 nas culturas com peptidoglicano, nas crianças filhas de mães atópicas, embora sem significado estatístico.²⁹⁰

Para além dos corticosteróides para o tratamento das doenças alérgicas, têm sido utilizadas outras armas terapêuticas que modulam o sistema imune, tal como a imunoterapia específica (ITE).

A documentação mais precisa da importância das células reguladoras no controlo das reacções alérgicas reside nos estudos efectuados em apicultores e em doentes alérgicos a veneno de himenópteros.²⁶⁶

Neste sentido destaca-se o trabalho de Pereira-Santos e colaboradores que concluíram do aumento da expressão de células reguladoras prospectivamente em doentes com alergia a veneno de himenópteros durante o esquema de imunoterapia específica.²⁹¹

A ITE consiste na administração de doses progressivamente crescentes de alergénio com a finalidade de diminuir a sintomatologia resultante de uma exposição natural a esse alergénio(s).²⁹²⁻²⁹⁴ Esta modalidade terapêutica tem demonstrado a sua eficácia na alergia a veneno de himenópteros, rinite alérgica e asma brônquica,²⁹⁵⁻²⁹⁷ estando demonstrado que pode alterar a história natural da doença alérgica, prevenindo o desenvolvimento de asma em doentes com rinite alérgica^{298,299} e ainda sensibilizações a

novos alérgenos.³⁰⁰ Estes estudos têm demonstrado alterações na reactividade da célula T após ITE (subcutânea ou sublingual), com redução das citocinas Th₂ e aumento da expressão de citocinas Th₁ (IL-2, IFN- γ e IL-12)²⁹²⁻³⁰⁰ e de células reguladoras.³⁰¹⁻³⁰⁵

Em 2003, Jutel e colaboradores demonstraram que em doentes com rinite alérgica, sensibilizados a ácaros do pó doméstico, após esquema de ITE para os mesmos alérgenos, por via subcutânea e com eficácia clínica, o enriquecimento de uma cultura celular com células CD4⁺CD25⁺ purificadas suprimia a proliferação celular, sendo este efeito específico de alérgeno.³⁰⁶

Dos estudos efectuados em doentes sob imunoterapia específica ressalta a ocorrência de estimulação de células reguladoras, documentada pelo aumento das citocinas supressoras (IL-10, TGF- β) e pelo desvio da resposta imune de Th₂ para Th₁.¹⁷²

A ITE está associada à indução de resposta Th1 e Tr1, com o aumento de IFN- γ e das citocinas reguladoras IL-10 (que conduz ao aumento da produção de IgG₄) e TGF- β (que conduz à produção de IgA), sendo o primeiro isótipo o mais frequentemente observado após imunoterapia.¹⁵⁵

No domínio das células reguladoras adaptativas é possível que as células Th3 estejam envolvidas na regulação de doenças gastrointestinais e que as células Tr1 se encontrem mais ligadas às doenças respiratórias, uma vez que as células dendríticas do tracto respiratório produzem IL-10, necessária para o desenvolvimento das células Tr1, e que as células dendríticas do tracto gastrointestinal produzem IL-10 e TGF- β , necessários para o desenvolvimento das células Th3.³⁰⁷

Por outro lado, as células Th1^{reg} também podem ter alguma importância, tal como foi sugerido por Cosmi e colaboradores em estudos de imunoterapia sublingual a *Dermathopagoides pteronyssinus* que documentaram um aumento significativo do número de células produtoras simultaneamente de IL-10 e IFN- γ .³⁰⁸

O conhecimento dos mecanismos protectores do aparecimento da asma e de outras doenças alérgicas ainda é limitado. É pouco provável que os mecanismos protectores da asma e de outras alergias estejam puramente relacionados com um desvio de perfil Th₂ para perfil Th₁.

Os diferentes tipos de células T reguladoras (Th3, Tr1, Th1^{reg}, CD4⁺CD25⁺) poderão estar envolvidos na supressão do desenvolvimento da asma e de outras doenças alérgicas, dando origem a respostas anti-inflamatórias.

1.4. Conceitos sobre a genética da asma brônquica

A expressão fenotípica da asma brônquica depende da interacção entre factores ambientais e a predisposição genética de um determinado indivíduo.³⁰⁹⁻³¹¹ Um dos objectivos importantes no estudo da asma é compreender essa predisposição genética. O conhecimento actual dos genes relacionados com a asma deve-se essencialmente aos diversos estudos que têm sido realizados em famílias ou comunidades isoladas. Como exemplo temos a comunidade da ilha de Tristão da Cunha onde a grande prevalência da asma foi atribuída a três colonos originais.³¹² Em termos gerais estima-se que a asma tenha uma heritabilidade, isto é, proporção de variação devida a factores genéticos, de 36 a 79%.^{311,313,314}

Um conhecimento claro do complexo envolvimento dos factores genéticos e ambientais na asma abre indubitavelmente expectativas para novas formas de tratamento. Nos últimos anos verificou-se um investimento considerável no estudo e compreensão dos factores genéticos inerentes à asma, porém a sua natureza multigénica tem dificultado o progresso.³¹⁵ Já foram identificadas várias regiões cromossómicas e variantes genéticas em genes candidatos, mas na maioria das vezes os resultados divergem quando reproduzidos, havendo diferenças significativas entre diferentes populações.^{316,317} Apesar de muitos genes terem sido identificados como de “susceptibilidade à asma”, como pode ser ilustrado pelo considerável número de revisões nesta matéria,³¹⁸⁻³²² ainda não existem dados que permitam prever com precisão o desenvolvimento ou não da doença num determinado indivíduo.

A dissecação genética da asma é um autêntico desafio, uma vez que se trata de uma doença complexa, que apresenta características como: i) multifactorial, sendo causada por factores genéticos e ambientais; ii) heterogeneidade, em que vários genes contribuem para a sua susceptibilidade; iii) penetrância reduzida, indivíduos não afectados podem ter genótipo de susceptibilidade; iv) existência de fenocópias, um fenótipo partilhado por indivíduos aparentados pode ser causado por factores meramente ambientais; v) expressão variável dos fenótipos, indivíduos com a mesma

susceptibilidade genética podem ter diferentes manifestações da doença; vi) interações gene-gene, diversos genes de susceptibilidade poderão interagir de forma complexa.^{323,324}

Métodos de identificação de genes de susceptibilidade

A identificação de genes de susceptibilidade pode ser obtida, de um modo geral, por dois métodos: pesquisa extensa do genoma (designado de *Genome wide screen* - GWS) ou por pesquisa de genes candidatos (Figura 2).³¹⁵

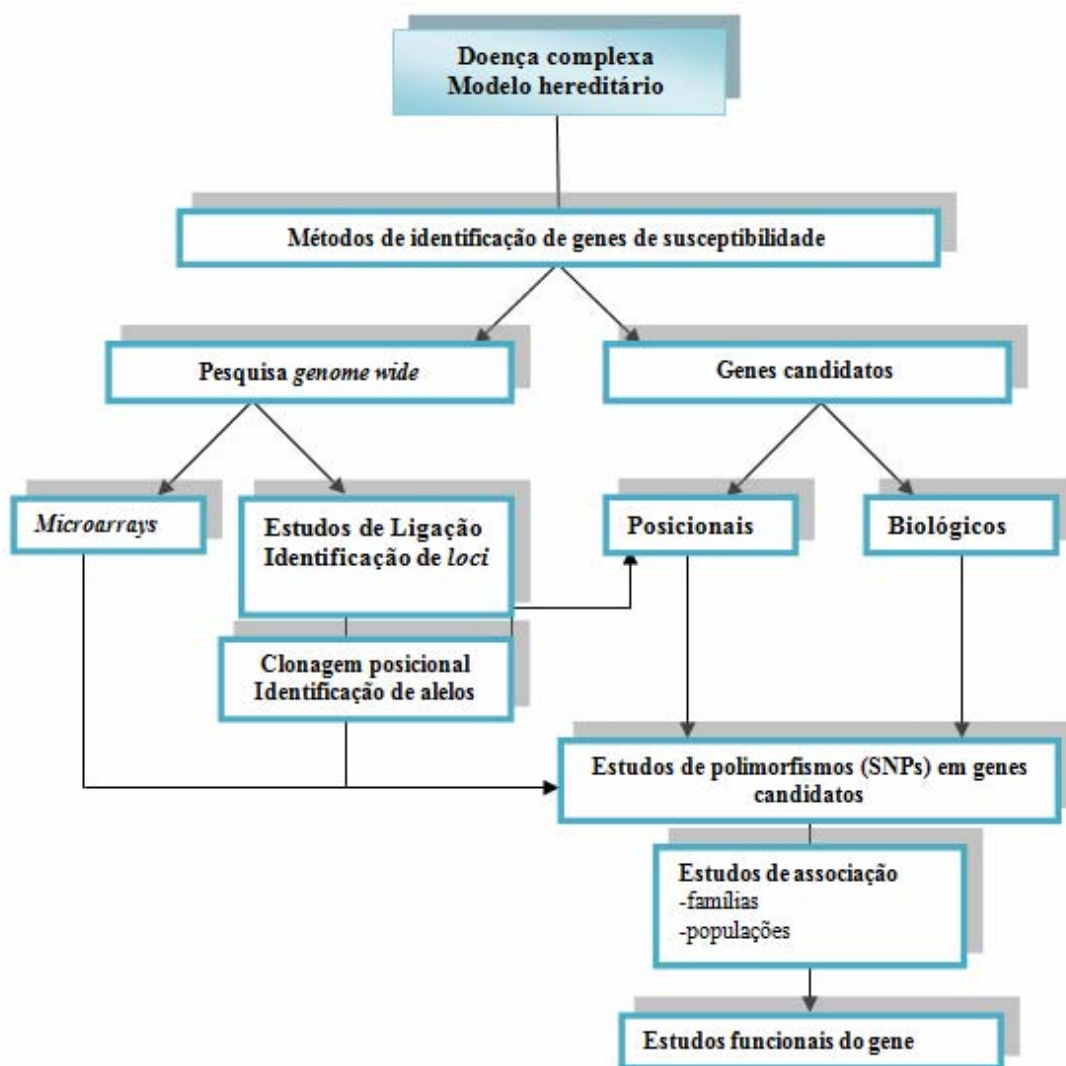


Figura 2 - Esquema representativo da metodologia utilizada para a identificação de genes envolvidos em doenças complexas.

O método de GWS permite a identificação de qualquer gene ou sequência reguladora, sem que haja um conhecimento prévio da sua função, ou seja, o genoma é analisado sem uma hipótese inicial de genes envolvidos na doença. Dentro deste método é possível efectuar estudos de ligação ou *microarrays*.

Os estudos de Ligação seguidos de Clonagem Posicional (*Positional cloning*) permitem o mapeamento e a identificação de genes com base na co-segregação de marcadores genéticos, isto é, permitem identificar regiões genéticas partilhadas entre famílias ou irmãos afectados (ex: asmáticos). As etapas envolvidas nestes estudos encontram-se descritas na Figura 3.

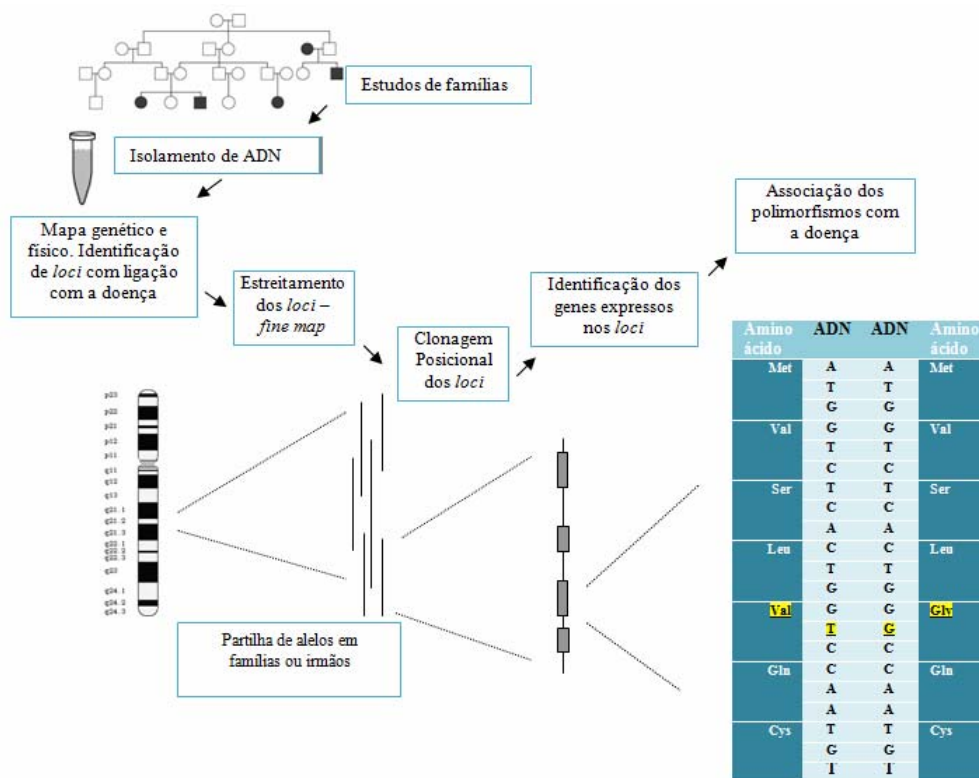


Figura 3 - Passos envolvidos num Estudo de Ligação seguido de Clonagem Posicional, utilizado para a pesquisa de genes envolvidos para a manifestação de doença.

Os resultados são expressos como *LOD score* (logaritmo das probabilidades), estimado através do método desenvolvido por Morton³²⁵ para calcular a probabilidade de um determinado fenótipo ter sido originado ao acaso ou por ligação genética.

Os estudos de clonagem posicional têm sido muito importantes para a identificação de genes associados à asma e aos fenótipos de asma.³¹⁵

Estes estudos de clonagem posicional podem ser efectuados por sequenciação de alta definição, polimorfismos de um só nucleótido (SNPs) e mapeamento por desequilíbrio de *linkage*.³¹⁵ Refira-se que os SNPs são responsáveis por cerca de 90% das variações do genoma, compreendendo modificações individuais nas bases nucleotídicas.³²⁶

A publicação do projecto do Genoma Humano em 2001, pelo *International Human Genome Sequencing Consortium*, disponível em *Ensembl* (Tabela II) e a posterior finalização da sua anotação em 2003 tem sido um grande contributo para o mapeamento de genes de susceptibilidade a várias doenças, não só porque revela novas sequências genéticas, mas também porque permite a utilização de novos marcadores genéticos a serem utilizados na identificação.

Tabela II. Locais de Interesse na *World Wide Web*

<p>Asthma & Allergy Gene Database</p> <p>Base de dados sobre estudos genéticos da asma descontinuada em 2003.</p>	<p>http://cooke.gsf.de/asthmagen/</p>
<p>Asthma Clinical Research Network</p> <p>Programa desenvolvido entre vários centros clínicos para avaliação de terapêuticas relacionadas com a asma.</p>	<p>http://www.acrn.org/</p>
<p>Ensembl</p> <p>Projecto entre vários institutos com a finalidade de anotar e manter genomas de vários organismos eucariotas.</p>	<p>http://www.ensembl.org/index.html</p>
<p>Global Allergy and Asthma European Network (GA²LEN)</p> <p>Rede europeia de centros de investigação científica sobre asma e alergias.</p>	<p>www.ga2len.net</p>

<p>International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)</p> <p>Estudo de colaboração multinacional com o objectivo de promover a investigação em asma, rinite alérgica e eczema.</p>	<p>http://isaac.auckland.ac.nz/</p>
<p>Murdoch Childrens Research Institute</p> <p>Glossário de termos genéticos.</p>	<p>http://www.genecrc.org/site/glos/index_glos.htm</p>
<p>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</p> <p>Base de dados pública, que permite pesquisa de informação biomédica, incluindo sequências de genes e polimorfismos, entre outras.</p>	<p>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</p>
<p>Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)</p> <p>Base de dados com genes humanos e anomalias genéticas.</p>	<p>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM</p>
<p>Rockefeller University - Genetic Analysis Software</p> <p>Página com endereços úteis de programas informáticos para estudos de Associação e de Ligação.</p>	<p>http://linkage.rockefeller.edu/soft</p>
<p>Global Initiative for Asthma (GINA)</p> <p>Programa de colaboração com o <i>National Heart, Lung, and Blood Institute</i>, <i>National Institute of Health</i> e <i>World Health Organization</i>, que envolve diversos profissionais de saúde, de diversos países, com o objectivo de reduzir a prevalência, morbilidade e mortalidade da asma.</p>	<p>www.ginasthma.com</p>

A estratégia de genes candidatos centra-se no estudo de variantes genéticas em genes distintos. Os genes a estudar são seleccionados se a sua função biológica sugerir que podem estar envolvidos na doença (candidatos biológicos) ou caso pertençam a uma região previamente identificada por Clonagem Posicional (candidatos posicionais). Podem ser casos-controlo, isto é, casos em populações (sem relação familiar), ou casos familiares, em que é analisada a transmissão de determinados marcadores genéticos de pais para filhos (teste de desequilíbrio de transmissão). Assim, para um gene seleccionado, são avaliadas as associações entre um ou mais polimorfismos e o fenótipo da doença.

Os polimorfismos de um só nucleótido (SNPs) são os polimorfismos mais comuns e podem ser detectados por diversas técnicas: reacção em cadeia da polimerase (PCR), restrição do ADN ou por sequenciação.

A selecção dos genes e dos polimorfismos a analisar é feita por pesquisa bibliográfica e em bases de dados públicas como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) - (Tabela II). Porém, a selecção de SNPs para estudo pode tornar-se extremamente difícil, não só pela escolha dos genes a estudar como no caso de doenças multigénicas como a asma, mas também por ser difícil prever o impacto funcional de um SNP. De facto, na análise de um resultado têm de ser considerados outros factores, tais como, a existência de outras alterações no gene ou nas suas regiões não codificantes (promotor, regiões não traduzidas -UTRs- e intrões) e o facto de cada alelo (variante de um gene) poder ser expresso de forma distinta.

É fundamental uma correcta interpretação dos estudos de associação entre um alelo e uma doença. Muitas das associações não comprovadas com genes candidatos não chegam a ser publicadas e, por outro lado, mesmo que se encontrem associações positivas, podem ser dadas diferentes explicações:³¹⁹

- O alelo afecta a função do gene, por alteração da sequência de aminoácidos da proteína codificada, alteração do *splicing* (processamento do ADN), instabilidade do ADN ou da proteína, afectando directamente o risco de desenvolver a doença.
- O alelo está em desequilíbrio de ligação com o verdadeiro alelo causador da doença, mas por si não afecta o risco de doença.

- A associação é um falso positivo, o que ocorre com mais frequência em estudos com poucos casos (como é na maioria das vezes), com múltiplas comparações (SNPs, genes e/ou fenótipos) ou fruto de erro de genotipagem.^{327,328}

1.4.1. Estudos da genética da asma: *Genome Wide Screen*

Nos últimos anos têm vindo a ser publicados diversos trabalhos com vista à identificação de marcadores genéticos de susceptibilidade para a asma através de estudos de ligação ou por *microarrays*.

Foram realizadas 17 *Genome wide screens* (GWS) para estudos de ligação de regiões genéticas com a asma (Tabela III) bem como com outros fenótipos associados à asma (atopia, IgE total sérica e hipersusceptibilidade brônquica), que estão descritos nas bases de dados *On-line Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) e *Asthma & Allergy Gene Database* (Tabela II). Os resultados variam substancialmente devido não só ao carácter multigénico da asma como às diferenças nos tipos de estudos (população, dimensão de amostras, métodos de análise).

Tabela III - Pesquisas *Genome-wide* para ligação de *loci* de susceptibilidade para a asma e/ou fenótipos relacionados com a manifestação desta doença.

Estudos	Amostras	<i>Loci</i> com ligação à asma e fenótipos (cromossomas)*
Daniels e col. 1996 ³²⁹	172 irmãos de 80 famílias asmáticas australianas	4q, 6, 7, 11q, 13q e 16**
CSGA 1997* ³³⁰	140 famílias americanas asmáticas, de três grupos étnicos diferentes	5p15 e 17p11.1-q11.2 (afro-americanos); 5q23-31, 6p21.3-23, 12q14-24.2, 13q21.3-qter, 14q11.2-13, 11p15 e 19q13 (caucasianos); 12q14-24.2, 2q33 e 21q21 (hispanicos)**
Ober e col. 1998 ³³¹	361 indivíduos asmáticos da população huterita	5q, 12q, 19q e 21q**

Hizawa e col. 1998 ³³²	45 famílias caucasianas e 53 afro-americanas	2q, 6p, 8p e 13q
Wjst e col. 1999 ³³³	156 irmãos asmáticos de 97 famílias alemãs	2p, 6p, 9, 12q
Dizier e col. 2000 ³³⁴	297 irmãos de 107 famílias asmáticas francesas	1p31, 11p13, 12q24 e 17q12-21.** Confirmação por <i>Fine-map</i> de 7q
Yokouchi e col. 2000 ³³⁵	197 irmãos afectados de 47 famílias japonesas	4p35, 5q31-q33, 6p22-p21.3, 12q21-q23, 13q11 e 13q14.1-q14.3
Ober e col. 2000 ³³⁶	693 indivíduos da população huterita, com parentesco até à 15ª geração	Inclusão dos <i>loci</i> 5p, 5q, 8p, 14q e 16q
Xu e col. 2001 ³²⁴	266 famílias americanas de três grupos étnicos diferentes*	5q31, 8p23, 12q22 e 15q13; 6p21 (caucasianos), 11q21 (afro-americanos), 1p32 (hispanicos)
Xu e col. 2001 ³³⁷	2551 indivíduos de 533 famílias chinesas (9 fenótipos associados)	2pter-2p25.2, 2p25.3, 10p15.3-10p15.1, 10p15.3, 22q12.3, 16p12.1, 19q12, 1q25.3-1q31.1, 1q31.1 e 4q21-q23
Laitinen e col. 2001 ³³⁸	220 indivíduos em 86 famílias finlandesas	7p15-p14**
Van Eerdewegh e col. 2002 ³³⁹	460 famílias caucasianas	20p13
Hakonarson e col. 2002 ³⁴⁰	596 indivíduos de 175 famílias islandesas	14q24

Haagerup e col. 2002 ³⁴¹	39, 45 e 57 pares de irmãos dinamarqueses	1p36, 3q21-q22, 5q31 e 6p24-p22.**
Postma e col. 2005 ³⁴²	200 famílias com familiares diagnosticados com asma	2q32 e 5q
Meyers e col. 2005 ³⁴³	200 famílias com um parente asmático, com ou sem exposição ao tabaco	3p e 5q
Wang e col. 2005 ³⁴⁴	190 crianças de Taiwan com asma alérgica ou não alérgica	5q31.3, 6q25 e 9p23 (alérgica) 6p25.1-6p24.3, 6p25.1, 8p12 e 19p13.1 (não alérgica)

Legenda da Tabela III: p= braço curto e q= braço longo dos cromossomas. * CSGA- Collaborative Study on the Genetics of Asthma – Estudo colaborativo suportado pelo National Heart, Lung and Blood Institute of the NIH (NHLBI/NIH). ** Estudos que envolveram uma ou várias replicações.

A reprodutibilidade dos resultados e a aplicação dos critérios recomendados aos estudos de ligação são factores que têm vindo a ser revistos e avaliados em diversos estudos.^{318,320,345,346} À partida, as regiões que foram confirmadas em vários estudos como apresentando vários genes candidatos e com resultados consistentes localizam-se nos cromossomas 2q (aumento da relação FEV₁/FVC e eosinofilia),^{320,324,334,336,342,347,348} 5q (asma com sensibilização a ácaros do pó doméstico),³³⁵ 6p,^{329,331,332} 12q^{349,350} e 13q.^{320,351,352}

Os grandes progressos na biologia molecular nos últimos anos têm possibilitado a realização de vários estudos de ligação com clonagem posicional entre famílias em estudo, de modo a identificar marcadores que possam ser associados a asma. Vários genes têm sido associados à asma, tais como: ADAM33, GPRA, PHF11, DPP10, HLA-G (Tabela IV).³⁵³

Tabela IV- Resumo dos genes relacionados com a asma e sua localização no genoma.

Gene*	Descrição	Cromossoma**	
EGR-1	Early growth response protein 1/ Proteína de resposta de crescimento precoce tipo 1	1p34	
PTGER3	Prostaglandin E receptor 3/ Receptor tipo 3 da Prostaglandina E	1p31	
CLCA1	Chloride channel calcium activated family member 1 / Proteína da família canal cloro activada por cálcio do tipo 1	1p31	
V-CAM 1	Vascular cell adhesion protein 1 precursor/ Proteína precursora das molécula de adesão vascular tipo 1	1p21	B'
GSTM1	Glutathione-S-transferase/ Glutatião-S-transferase	1p13	B
A3AR;ADORA3	Adenosine A3 receptor/ Receptor adenosina A3	1p13	
SELP	P-selectin/ P-selectina	1q23-25	B
IL10	Interleukin-10/ Interleucina 10	1q31	B
A1AR;ADORA1	Adenosine A1 receptor/ Receptor adenosina A1	1q32	
TGF- β -2	Transforming growth factor beta 2 precursor/ Percursor do factor crescimento celular beta 2	1q41	
IL-1R1	Interleukin-1 receptor / Receptor da Interleucina 1	2q11	
IL-1RN	Interleukin-1 receptor antagonist protein precursor/ Percursor da proteína antagonista do receptor da Interleucina 1	2q13	BP
IL-1 α	Interleukin-1 alpha precursor / Percursor Interleucina 1 alfa	2q13	B
IL-1 β	Interleukin-1 beta precursor/Percursor Interleucina 1 beta	2q13	B

DPP10	Dipeptidylpeptidase 10 isoform 1/ Isoforma 1 da dipeptilpeptidase 10	2q14	P
HNMT	Histamine N-methyltransferase/ Histamina-N-metiltransferase	2q22	B
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4/ Transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 4	2q32	P
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated 4/ Molécula tipo 4 associada a linfócito T citotóxico	2q33	
IL-8RA; CXCR1	High affinity interleukin-8 receptor A/ Receptor de alta afinidade para IL-8	2q35	
CCR1	C-C chemokine receptor type 1/ Receptor de quimocina tipo 1	3p21	
CCR2	C-C chemokine receptor type 2/ Receptor de quimocina tipo 2	3p21	
CCR3	C-C chemokine receptor type 3/ Receptor de quimocina tipo 3	3p21	B
CCR5	C-C chemokine receptor type 5/ Receptor de quimocina tipo 5	3p21	B
TLR9	Toll-like receptor 9/Receptor Toll like 9	3p21.3	
CCR4	C-C chemokine receptor type 4/ Receptor de quimocina tipo 4	3p24	
TLR10	Toll-like receptor 10/ Receptor Toll like 10	4p14	B
MUC7	Mucin 7/ Mucina 7	4q13-21	B
IL-8	Interleukin-8 precursor / Percursor da IL-8	4q13	
PGDS	Prostaglandin D synthase/ Sintetase da prostaglandina D	4q21-22	B
APA	Aminopeptidase A	4q25	
IL-5	Interleukin-5 precursor/ Percursor da IL-5	5q31	
IL-4	Interleukin-4 precursor/ Percursor da IL-4	5q31	B
IL-13	Interleukin-13 precursor/ Percursor da IL-13	5q31	B

IL-9	Interleukin-9 precursor/Percursor da IL-9	5q31	
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14 precursor/ Percursor do antígeno de diferenciação dos monócitos CD14	5q31	B
IRF1	Interferon regulatory factor 1/Factor de regulação do interferão tipo 1	5q31	B
CSF2	Colony stimulating factor 2/ Factor de estimulação de colónias tipo 2	5q31	B
Tim-1	T cell immunoglobulin and mucin- domain 1/ Domínio tipo 1 das mucinas, imunoglobulinas e célula T	5q31-33	B P
IL12B	Interleukin-12 beta precursor/Percursor beta da IL-12	5q31-33	B
UGRP1	Uteroglobin-related protein 1/Proteína tipo 1 relacionada com uteroglobina	5q31-34	
SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5 precursor/ Percursor do inibidor da serina protease Kazal tipo 5	5q32	P
ADRB2	Beta-2 adrenergic receptor/ Receptor beta-2 adrenérgico	5q32	B
GPX3	Plasma glutathione peroxidase precursor/ Percursor glutatião peroxidase plasmática	5q33	
SLP-2 LCP2	SH2 domain-containing leucocyte protein/ Proteína leucocitária domínio SH2	5q35	
SLP-76	Lymphocyte cytosolic protein 2/ Proteína linfocítico citosólica tipo 2	5q35	
HLA G	HLA class I histocompatibility antigen – alpha chain G precursor/ Percursor da cadeia alfa G do complexo major de histocompatibilidade classe I	6p21	P
HLA-DRB1	Major histocompatibility complex -class II - DR beta1/ Complexo major de histocompatibilidade classe II- DR beta1	6p21	B P

TAP1	Transporter/ Transportador	6p21	B
LTA	Lymphotoxin-alpha/ Linfotóxina-alfa	6p21	B
TNF- α	Tumor necrosis factor precursor/ Precursor do factor de necrose tumoral alfa	6p21	B P
PIM1	Pim-1 oncogene/ Oncogene Pim-1	6p21	
PAF-2	Peroxisome assembly factor-2/ Factor 2 semelhante ao peroxisoma	6p21	
PAFAH	Platelet activating factor acetylhydrolase/ Acetilhidrolase do factor activador das plaquetas	6p21	B
ARG1	Arginase I/ Arginase I	6p23	
SOD2	Superoxide dismutase 2 mitochondrial/ Superóxido dismutase mitocondrial	6q25	
IL-6	Interleukin-6/ Interleucina 6	7p15	
GPRA	G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility/ Receptor da proteína G associado a susceptibilidade para asma	7p14	P
TCRG	T cell receptor gamma/ Receptor gama da célula T	7p14	
EGFR	Epidermal growth factor receptor precursor/ Precursor do receptor do factor de crescimento epidérmico	7p11	
EOTAXIN2	Eotaxina 2/ Eotaxina 2	7q11.23	B
PAI-1 SEPRINE1	Plasminogen activator inhibitor-1 precursor/ Percursor do activador-inibidor do plasminogénio tipo 1	7q22	
eNOS; NOS3	Nitric-oxide synthase – endothelial/ Sintetase do óxido nítrico endotelial	7q36	
PAF-1	Peroxisome assembly factor-1/ Factor semelhante peroxisoma tipo 1	8q21	
PTGES	Prostaglandin E synthase/ Prostaglandina E sintetase	9q34	

IKAP	I-kappaB-associated protein/ Proteína associada ao factor I-kappaB	9q34	B
C5	Complement factor 5/ Factor de complemento 5	9q34.1	B
GATA3	GATA-binding protein 3/ Proteína 3 de ligação ao factor GATA	10p15	P
MUC2	Mucin 2/ Mucina 2	11p15	
PTGDR	Prostaglandin D2 receptor/ Receptor da prostaglandina D2	11q	
FcεRIβ	High affinity immunoglobulin epsilon receptor beta-subunit/ Subunidade beta do receptor de alta afinidade	11q12.1	B'
GSTP1	Glutathione-S-transferase/ Glutathione-S-transferase	11q13	B'
CD69	Early activation antigen CD69/ Antígeno de activação precoce CD69	12p13	
VDR	Vitamin D3 receptor/ Receptor da vitamina D3	12q13	B
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6/ Transdutor de sinal e activador de transcrição tipo 6	12q13	B' P
AICDA	Activation-induced cytidine desaminase / Citidina desaminase induzida por activação	12p13	B
IRAK3	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3/ Cinase associada a receptor da Interleucina 1	12q14	
IL-22	Interleukin-22 precursor/ Precursor da Interleucina 22	12q15	
IFN-γ	Interferon gamma precursor/ Precursor do Interferão gama	12q15	B'
KITLG	Kit ligand precursor/ Precursor do kit ligando	12q21	
NF-YB	Nuclear transcription factor Y subunit beta/ Subunidade beta factor transcrição nuclear Y	12q23	

nNOS; NOS1	Nitric-oxide synthase type I/ Sintetase óxido nítrico tipo 1	12q24	B'
SETDB2	SET domain bifurcated 2/ Domínio bifurcado SET tipo 2	13q14	P
PHF11	PHD finger protein 11/ Proteína tipo PHD 11	13q14	P
RCBTB1	Regulator of chromosome condensation/ Regulador da condensação cromossómica	13q14	
RCC1; RCBTB1	Regulator of chromosome condensation/ Regulador da condensação cromossómica	13q14	
PTGER2	Prostaglandin E receptor 2/ Receptor 2 da prostaglandina E	14q22	
ARG2	Arginase II/ Arginase II	14q24	
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin precursor / Percursor da antiqumiotripsina alfa-1	14q32	
ERK-3	Extracellular signal-regulated kinase 3/ Cinase tipo 3 regulação de sinal extracelular.	15q21	
IL4RA	Interleukin 4 receptor alpha chain/ Cadeia alfa do receptor da interleucina 4	16p12	B
ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase/ Araquidonato 15 lipoxigenase	17p13	
iNOS; NOS2	Nitric oxide synthase – inducible/ Sintetase indutível do óxido nítrico	17q11	
RANTES	Random and activate normal T cell-expression and secreting	17q11-q12	B'
CCL2;MCP-1	Small inducible cytokine A2 precursor/ Pequeno precursor indutível da citocina A2	17q12	B'
CCL7;MCP-3	Small inducible cytokine A7 precursor/ Pequeno precursor indutível da citocina A7	17q12	
SCCA-1 SerpinaB4	Squamous cell carcinoma antigen 1/ Antígeno tipo 1 do carcinoma células escamosas	18q21	

Fc-ε-RII; CD23	Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor/ Receptor de baixa afinidade Fc epsilon	19p13	
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 precursor/ Percursor intracelular de molécula de adesão tipo 1	19p13	
TBXA2R	Thromboxane A2 receptor/ Receptor do tromboxano A2	19p13	B
PTGER1	Prostaglandin E receptor 1/ Receptor 1 da prostaglandina E	19q13	
TGF-β-1	Transforming growth factor beta 1 precursor/ Percursor do factor de transformação e crescimento tipo 1	19q13	B'
ADAM33	Disintegrin and metalloproteinase domain 33/ Desintegrina e metaloproteinase no domínio 33	20p13	P
SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]/ Superóxido dismutase [Cu-Zn]	21q22	
CBR1	Prostaglandin-E(2) 9-reductase/ Prostaglandina E2 reductase	21q22	
GSTT1	Glutathione-S-transferase/ Glutatioão-S-transferase	22q11	
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1/ Inibidor tecidual da metaloproteinase tipo 1	Xq11	
SYBL1	Synaptobrevin-like protein 1/ Proteina 1 sinaptobrevina like	Xq28	
CD24	Signal transducer CD24 precursor/ Percursor do sinal de transdução CD24	Yq11	
SYBL1	Synaptobrevin-like protein 1/ Proteina 1 sinaptobrevina like	Yq12	

Legenda da Tabela IV: Encontram-se assinalados os candidatos posicionais (P), os candidatos biológicos (B) e os candidatos biológicos cujo *loci* apresenta também ligação à asma (B'), que foram sujeitos a estudos de associação (identificação de polimorfismos). Os restantes genes foram identificados apenas em estudos de ligação ou de expressão (*Microarray*) com estudo de associação não definido. Os dados foram obtidos a partir do estudo da literatura e da pesquisa na base de dados pública NCBI, encontrando-se ordenados por cromossoma. *Número do cromossoma; símbolo do braço; (p designa o braço curto e q o braço longo); o número da região e banda.

Na região do *cluster* da interleucina-1 (IL-1), no cromossoma 2q14, foram identificados dois candidatos posicionais, **IL-1RN** que codifica um antagonista do receptor de IL-1 e **DPP10** que codifica uma dipeptidil-peptidase.^{354,355} Num estudo foram identificadas associações entre SNPs de IL-1RN e a asma,³⁵⁵ não tendo sido analisado o gene DPP10. Noutro estudo, com diferentes populações, Allen e colaboradores³⁵⁴ reportaram uma falta de associação entre IL-1RN e a asma, mas demonstraram uma associação de SNPs no gene DPP10, localizado também no *cluster* de IL-1. Todavia, estes resultados são pouco conclusivos, dada a falta de reprodutibilidade.

O gene **SPINK5** (cromossoma 5q32), que codifica um presumível inibidor de proteases de serina, foi associado à asma num vasto estudo populacional.³⁵⁶ Porém, não foi identificada qualquer associação num estudo posterior realizado com famílias com pelo menos um indivíduo afectado.³⁵⁷

O cromossoma 13q14, um dos *loci* que apresenta uma das maiores consistências de ligação com a asma, foi analisado com maior detalhe (*fine map*) e revelou uma associação, com a ocorrência de asma, de alelos do gene **PHF11**, que codifica um presumível regulador de transcrição e do gene adjacente **SETDB2** de função desconhecida.³⁵⁸ Também, nestes casos, não foi registada qualquer reprodução da associação.

O gene **GPRA** (cromossoma 7p14), que expressa um receptor cujo ligando se desconhece, também foi identificado como gene de susceptibilidade para a asma.³⁵⁹ A associação de SNPs, identificada neste trabalho inicial,³⁵⁹ foi observada em dois outros estudos.^{360,361} Porém, nem sempre foi possível detectar essa associação.³⁶²

STAT6 (*Signal transduction and activator of transcription 6*) é um factor de transcrição, cuja activação específica é crítica para uma série de efeitos mediados pela IL-4, incluindo a indução de células Th₂, a resposta com IgE, a inflamação e a hipersusceptibilidade das vias aéreas.³⁶³ Além disso, o respectivo gene localiza-se no cromossoma 12q13, uma região ligada à asma em diversos estudos de ligação em GWS, o que faz dele um candidato biológico e posicional para a susceptibilidade a esta patologia. Num estudo com duas populações foi estabelecida a associação de um SNP de **STAT6** com a asma em doentes japoneses mas não em doentes britânicos.³⁶⁴ Polimorfismos distintos, neste gene, têm vindo a ser associados com a asma.³⁶⁵⁻³⁶⁷ Os estudos são por vezes contraditórios no que se refere aos mesmos polimorfismos,³⁶⁸ contribuindo para esta complexidade as diferenças étnicas e clínicas. Aparentemente, existe uma melhor associação de variantes deste gene com eosinofilia e regulação dos níveis de IgE total sérica do que com asma.³⁶⁸⁻³⁷⁰

O gene **ADAM33** (*A Desintegrin and Metalloprotease 33*), que codifica uma metaloproteinase, foi o primeiro candidato posicional a ser identificado para a asma, por Van Eerdewegh e colaboradores.³³⁹ Localiza-se no cromossoma 20p13, uma região que, em estudos anteriores, apresentava uma modesta evidência de ligação.³²⁴

Este é talvez o gene com mais estudos confirmados de associação à asma,³⁷¹⁻³⁷⁶ tendo sido referidos 17 SNPs diferentes, neste gene, relacionados a possível risco de asma.³⁷⁷ Contudo, existem também estudos onde não foi observada qualquer associação.^{317,378,379} Num estudo extenso com 4 etnias americanas distintas, Howard e colaboradores³⁸⁰ referem associações entre SNPs de ADAM33 e asma, para cada uma dessas etnias, sem que um só SNP pudesse ser associado no conjunto das populações. Com o objectivo de rever a metodologia utilizada nos estudos anteriores e de ultrapassar a inconsistência dos resultados obtidos, foi recentemente elaborada uma meta-análise, que envolveu a maioria dos resultados publicados, bem como novos resultados, tendo-se demonstrado que, na verdade, apenas alguns SNPs de ADAM33, eventualmente com efeito na actividade enzimática da proteína, estariam associados a um risco acrescido de asma.³⁷¹

A proteína codificada por ADAM33 é uma metaloproteinase, ancorada à superfície celular, com dois domínios funcionais: um de desintegrina, que promove a adesão a integrinas e outro de metaloproteinase, que medeia a proteólise.³³⁹ De função biológica pouco clara, a proteína ADAM33 poderá conduzir à susceptibilidade à asma e à

hipersusceptibilidade brônquica por alterar a libertação de citocinas ou por inactivar os receptores que transmitem a sua acção.³⁸¹

ADAM33 é expresso principalmente no músculo liso brônquico e por fibroblastos pulmonares, sugerindo um papel importante na remodelação das vias respiratórias.³⁷⁷ De facto, estudos recentes de associação genética sugerem que este gene está também relacionado com a reparação, crescimento^{372,375} e debilidade da função pulmonar durante a infância.^{372,374,375}

Tendo em conta os resultados de associação com a manifestação da asma, o papel de ADAM33 nesta doença mantém-se controverso e é provável que seja complexo, envolvendo uma combinação de SNPs, sendo imprescindível a obtenção de um maior número de dados e um estudo mais aprofundado do seu papel.

O gene identificado mais recentemente por Clonagem Posicional como tendo associação com a asma foi o **HLA-G**.³⁸² A ligação do cromossoma 6p21, onde este gene se localiza, foi descrita em vários GWS. A evidência de associação de HLA-G com asma e hipersusceptibilidade brônquica foi observada num só estudo, em famílias de 4 populações distintas.³⁸² Neste estudo, foi também observada, uma associação diferencial de alelos de HLA-G com asma na criança no caso de as mães apresentarem hipersusceptibilidade brônquica.³⁸²

Ao contrário das moléculas de HLA clássicas, a molécula de HLA-G parece desempenhar uma função anti-inflamatória. É fortemente expressa em tecido da placenta, onde desempenha um papel imuno-regulador, promovendo a tolerância da mãe ao feto alogénico.^{383,384} Recentemente tem-se vindo a verificar que existe também expressão de HLA-G em diversos tumores, células infectadas por vírus e determinadas doenças crónicas, o que leva a pressupor que esta molécula tenha uma função imunossupressora generalizada, funcionando como inibidora da citotoxicidade *Natural Killer* e T e podendo ter um papel no controlo da autoimunidade.^{385,386}

Rizzo e colaboradores observaram que a secreção de IL-10 em doentes com asma se encontra deficitária, podendo este facto estar relacionado com a diminuição da expressão de HLA-G pelas células destes doentes.³⁸⁷ A diminuição da expressão da

molécula imunossupressora HLA-G pode assim contribuir para a persistência de inflamação crónica na asma.

Os *Microarrays* constituem uma alternativa recente, que possibilita o estudo da expressão de um grande número de genes em simultâneo. Neste método, em vez de se estudar o gene em si, analisa-se o ARN de uma determinada amostra, permitindo o estudo da expressão de um determinado gene num tecido ou célula. O *Microarray*, para além de ser rápido, tem a vantagem de permitir a análise de milhares de genes em simultâneo e, desta forma, analisar a coordenação entre os vários genes envolvidos na doença, embora alguns autores considerem ser um método ainda a otimizar e dispendioso.

Os *Microarrays* são uma ferramenta promissora e excelente para confirmação de observações anteriores, podendo providenciar novos indicadores sobre as vias metabólicas envolvidas na fisiopatologia da asma.

De facto, tem sido demonstrado que centenas de genes têm expressão desigual em amostras diversas como: eosinófilos,³⁸⁸ mucosa bronquiolar,³⁸⁹ linfócitos T CD4⁺,³⁹⁰ epitélio nasal,³⁹¹ epitélio respiratório³⁹² e cultura de células epiteliais bronquiolares.³⁹³

Nestes trabalhos foram publicadas alterações na expressão de genes variados, envolvidos em diversos processos biológicos. Porém, os resultados variavam com as amostras e, muitas vezes, os mais evidentes nem sempre se relacionavam com os mecanismos descritos para a asma, envolvendo acima de tudo alterações decorrentes da asma, isto é, alterações dos tecidos como resposta à agressão.^{394,395}

O grande inconveniente destes estudos tem sido precisamente a interpretação dos resultados obtidos. Por vezes é difícil relacionar as alterações obtidas de expressão de genes com características fisiopatológicas da asma, com os mediadores específicos envolvidos ou com o tipo de células.³⁹⁴⁻³⁹⁶ Existe igualmente uma grande dificuldade na comparação dos dados entre amostras diferentes ou mesmo entre laboratórios. Na maioria das vezes, apenas uma pequena parte dos dados obtidos acabam por ser usados e publicados, sendo provável que um número considerável de trabalhos iniciados com *Microarrays* permaneça por publicar. É imprescindível que haja uma validação e confirmação dos resultados com outra tecnologia (PCR em tempo real ou quantitativo,

Northern blotting, citometria de fluxo), para além do conhecimento funcional e biológico do gene (função, polimorfismos, interacção dos produtos com diversos processos).

Recentemente foi criado o projecto *Global Allergy and Asthma European Network* (GA²LEN) com o propósito de estabelecer redes de excelência a nível europeu no campo da alergia e asma. Entre os vários objectivos deste projecto encontram-se a integração de um centro de dados para a troca rápida de informação entre os laboratórios envolvidos e o estabelecimento de critérios de apreciação relacionados com a investigação genómica. O potencial da tecnologia *Microarray* poderá então ser completamente explorado quando os dados forem partilhados e se encontrarem disponíveis entre a comunidade científica.

1.4.2. Estudos de associação à asma com candidatos biológicos

Nestes estudos são seleccionados genes para os quais existe um conhecimento prévio de que a sua função biológica está implicada na fisiopatologia da asma.

Os estudos de associação podem ser mais poderosos que os estudos de ligação. Com as novas tecnologias mais precisas para a sequenciação de ADN e genotipagem de SNPs, o número de genes candidatos tem vindo a aumentar substancialmente.³¹⁵

Após a identificação de genes é muito importante explorar as consequências funcionais da variação genética observada por associação. Muitos dos variantes observados não têm consequências funcionais. De facto, os polimorfismos podem ser silenciosos, não afectando a estrutura do gene ou expressão, ocorrendo no mesmo ou em genes contíguos.^{315,353}

Para os polimorfismos de um só nucleótido (SNPs) nas regiões codificantes é possível prever empiricamente as consequências para a estrutura proteica e sua função. No entanto, a maioria dos polimorfismos de um só nucleótido (SNPs) encontram-se em regiões não codificantes do ADN. A expressão génica pode ser alterada pela modificação dos locais de ligação para os factores de transcrição, no caso de existirem variantes localizados na região do promotor. As variantes na região do intrão podem alterar o *splicing* alternativo numa célula ou tecido.³¹⁵

As sequências não codificantes, que constituem cerca de 30% do genoma humano, têm uma importante função como reserva major de ADN com função reguladora.^{397,398}

Refira-se que recentemente a investigação tem vindo a ser conduzida para variantes em fenocópias que se encontram espalhadas no genoma humano e podem ter consequências funcionais mais importantes que os SNPs.³⁹⁹

É geralmente aceite que o processo inflamatório que se observa na asma é o resultado de uma resposta imune inapropriada a uma variedade de antigénios ubíquos ou inócuos, em indivíduos geneticamente susceptíveis, pelo que muitos estudos têm sido efectuados em genes de citocinas, na região do complexo major de histocompatibilidade (MHC) e nos genes de receptores de citocinas e de imunoglobulinas.

Os resultados dos estudos de associação destes candidatos biológicos com a asma variam consideravelmente, havendo, por vezes, resultados díspares entre diferentes populações, bem como ausência de confirmações posteriores, tornando-se difícil determinar se as associações que foram publicadas são relevantes. No entanto, parece haver mais estudos e resultados com maior consistência com os genes envolvidos nas vias das interleucinas IL-4 e IL-13.

Os genes da IL-4 e IL-13 encontram-se entre os candidatos biológicos que têm sido associados, num número considerável de estudos, com a asma.^{323,400-409} Estes genes localizam-se numa região do cromossoma (5q31), denominada de “*cluster* das interleucinas” por conter diversos genes envolvidos na resposta imune, incluindo interleucinas pró-inflamatórias (Tabela III).

Nas doenças alérgicas existe uma resposta imune caracterizada pela produção das interleucinas IL-4 e IL-13. O conhecimento actual sobre os papéis desempenhados por estas moléculas na patogénese da asma foi alvo de várias revisões na literatura.^{160,410,411}

O gene da IL-13 é um bom candidato como gene de susceptibilidade para a asma, uma vez que a IL-13 é uma citocina produzida pelas células Th₂, promovendo a hipersusceptibilidade brônquica associada à exposição alérgica, hiperplasia das células caliciformes com produção de muco e eosinofilia, existindo vários estudos que comprovam a sua relação com a asma e seus fenótipos.^{342,412,413}

Os vários polimorfismos no gene da IL-13, que têm sido associados à asma, incluem polimorfismos na zona do promotor^{403,408} e na zona codificante do gene.^{401,402} Arima e colaboradores^{414,415} demonstraram que um dos polimorfismos, no exão 4 do gene, resulta numa variante funcional com menor afinidade para o receptor IL-13R α 2. Por conseguinte, esta variante apresenta uma taxa de eliminação menos eficaz, o que se correlaciona com o facto de doentes asmáticos com este polimorfismo apresentarem níveis elevados de IL-13.^{414,415} Para além da associação com asma, foram identificados polimorfismos em IL-13 relacionados com níveis elevados de IgE total sérica⁴⁰¹ e até mesmo com exacerbação da asma.⁴¹⁶

Os polimorfismos identificados no gene da IL4 associados a asma localizam-se em regiões não codificantes e apresentam resultados menos consistentes que os obtidos para o gene da IL-13.^{417,418} Por outro lado, o receptor ILR-4R α , comum a estas duas interleucinas, apresenta uma forte evidência de associação à asma.^{323,405,419} Dois polimorfismos distintos localizados na região codificante deste gene foram relacionados em ensaios experimentais *in vitro*, com a produção de IL-13⁴²⁰ e com níveis elevados de IgE total sérica,⁴²¹ embora estudos subsequentes de associação tenham mostrado resultados controversos.^{422,423}

O gene da subunidade β do receptor de alta afinidade para a IgE (FC ϵ R1 β) apresenta também um número considerável de publicações associando-o com asma.^{406,424-427} Foram também associados à asma alguns polimorfismos do gene da glutationa-S-transferase, GSTP1,⁴²⁸⁻⁴³¹ localizado na mesma região do cromossoma que FC ϵ R1 β . Interessante notar que alguns autores referiram uma associação materna, mas não paterna, de variantes deste gene^{432,433} com asma infantil, suportando a hipótese de hereditariedade materna proposta por alguns autores relativamente à asma. Moffat e colaboradores num estudo efectuado em Oxford comprovaram que o fenótipo para níveis elevados de IgE total e IgE específica para alérgénio teria uma associação materna, mas não paterna, com uma ligação ao cromossoma 11q.⁴³⁴

Para além de GSTP1, outros genes de glutationa-transferases envolvidos no stress oxidativo, como GSTT1 e GSTM1, foram também relacionados com a asma.⁴³⁵⁻⁴³⁷

A região do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC), situada no cromossoma 6p, tem sido ligada à asma em vários GWS e, contém muitos genes envolvidos na

imunidade inata e adquirida. Os antígenos leucocitários humanos HLA (*Human leucocyte antigens*) da classe II (HLA-DRB1), o factor de necrose tumoral (TNF- α) e a α -linfotoxina (LTA) são os candidatos biológicos desta região com maior número de associações com a asma.⁴³⁸ Nalguns estudos verificou-se que apesar de não existir associação com cada um destes genes individualmente, esta existe quando os genes TNF- α e DRB1⁴³⁹ ou TNF- α e LTA⁴³⁸ são considerados em conjunto.

As eotaxinas (eotaxina 1, eotaxina 2 e eotaxina 3) são outros candidatos biológicos de associação com a asma por serem potentes indutores da quimiotaxia de eosinófilos. Estes efeitos são mediados essencialmente pelo receptor CCR3, que é altamente expresso em eosinófilos, basófilos e linfócitos Th₂ e, portanto, envolvidos na inflamação alérgica. Vários autores observaram uma associação entre determinados polimorfismos nesta família de genes e a susceptibilidade à asma.⁴⁴⁰⁻⁴⁴⁴

Refira-se também a existência de alguns estudos que documentam uma associação entre polimorfismos do gene para o receptor da vitamina D e asma, embora tenham chegado a resultados díspares quanto aos alelos associados a doença e os alelos associados à protecção para a mesma,^{445,446} havendo no entanto outros estudos que não comprovaram a existência de qualquer associação.^{447,448} No estudo CAMP (*Childhood Asthma Management Programme*) verificou-se a associação do gene do receptor da vitamina D não só com asma, mas também com a deterioração da função respiratória com queda da razão FEV₁/FVC.⁴⁴⁶

Recentemente, foi publicado por Moffatt e colaboradores uma forte associação de asma na criança com SNPs no gene de ORMDL3, num estudo de coorte britânico e em casos controlo alemães.⁴⁴⁹

O gene de ORMDL3 encontra-se mal caracterizado, sendo o seu mecanismo de associação à asma pouco esclarecido. ORMDL3 é membro da família de proteínas de membrana do retículo endoplasmático ubiquitária no humano.⁴⁵⁰

Têm vindo a ser publicados trabalhos que associam polimorfismos dos genes da arginase,⁴⁵¹ TGF- β ^{452,453} e da aciloxil hidroxilase (AOAH, enzima que hidroliza secundariamente os ácidos gordos dos LPS),⁴⁵⁴ sendo necessários mais estudos para esta comprovação.

Também a associação entre o gene da filagrina e asma permanece controversa, porquanto a sua expressão só ocorre nos doentes com asma e eczema atópico, sendo controverso que a associação não seja apenas com eczema.⁴⁵⁵

A respeito dos polimorfismos do adrenoreceptor β_2 , apesar da grande maioria da investigação sobre os mesmos residir na interferência na resposta individual dos indivíduos asmáticos à administração de broncodilatadores, no domínio da farmacogenética (não abrangida neste estudo), vários estudos têm documentado uma possível associação dos mesmos com asma, bem como com uma alteração da avaliação funcional respiratória, particularmente na criança.⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁸

Os últimos estudos sobre polimorfismos e asma brônquica têm vindo a evidenciar um papel do gene CHI3L1 associado a asma, hipersusceptibilidade brônquica e alteração da função pulmonar. Este gene codifica a expressão de quitinase YKL-40, podendo a sua quantificação no soro constituir um biomarcador de asma e declínio da função respiratória, encontrando-se ainda pouco esclarecido o papel das quitinases na patogénese da asma.⁴⁵⁹

O estudo da genética da asma tem vindo a evoluir espantosamente num curto espaço de tempo, pelo que é provável que muitos mais genes venham a ser identificados no futuro. A abordagem genética contribui para um melhor conhecimento da fisiopatologia da asma e permitirá identificar novas vias que conduzirão ao desenvolvimento de novos fármacos preventivos, em caso de indivíduos com genótipos de susceptibilidade, e terapêuticas aplicadas de forma criteriosa, de acordo com o genótipo individual do doente.

Contudo, dado a complexidade da asma, é evidente que não existe um gene ou grupo de genes de susceptibilidade para a asma e que o desenvolvimento da doença num indivíduo depende da interacção de genes, com um efeito moderado na doença, com diversos factores ambientais.⁴⁶⁰

Alguns dos factores ambientais que podem contribuir para a susceptibilidade genética incluem a exposição a endotoxinas, a partículas diesel, ao fumo de tabaco, a aeroalergénios ambientais, a infecções virais e ainda à dieta e a factores intra-uterinos.³⁵³

A inclusão destes factores nos estudos genéticos tem permitido o estudo da interacção gene e ambiente. Um exemplo da interacção gene-ambiente foi documentado entre CD14 e a exposição a endotoxinas. A diminuição da exposição a endotoxinas e da consequente estimulação do sistema imune inato tem contribuído para o aumento da sensibilização a alergénios.⁴⁶¹ Os receptores para as endotoxinas são os receptores *Toll-like* tipo 4 com a molécula co-receptora CD14. Os polimorfismos no gene de CD14 conduzem a modificações funcionais na expressão do gene, tendo sido documentada a associação de polimorfismos no receptor *Toll-like* tipo 4 e asma.⁴⁶²

Por outro lado, dada a panóplia de genes que podem ser genotipados, é possível examinar a relação estatística entre estes, de modo a estudar a sua possível interacção. Tal como referido anteriormente, têm vindo a ser descritos polimorfismos dos genes da IL-4 e da IL-13 associados à asma.^{422,463} Existe também evidência que diferentes alelos dos genes da IL-4 e IL-13 podem interagir e resultar em risco acrescido de asma.⁴⁶⁴

Uma das áreas que tem vindo a despertar um interesse crescente em genética consiste no estudo epigenético da modificação da expressão génica. A epigenética é definida como modificação na expressão génica que pode ser herdada e é independente de alterações da sequência de ADN, mas depende de alterações enzimáticas no ARN e nas proteínas histonas.

Um bom conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares da asma e da complexa interacção entre os factores genéticos e ambientais abrirá novas perspectivas para a intervenção terapêutica.

Para além do seguimento clínico dos doentes com asma brônquica, pode objectivar-se a existência de alterações nas suas provas funcionais respiratórias que devem ser monitorizadas.

1.5. Provas de função respiratória

As provas de função respiratória são instrumentos fundamentais para a caracterização e seguimento das doenças respiratórias na criança e no adulto, nomeadamente na asma brônquica, sendo úteis na sua confirmação diagnóstica, avaliação da eficácia terapêutica e prognóstico.^{465,466}

No lactente são utilizadas fundamentalmente na investigação clínica e epidemiológica, de modo a ter uma medição objectiva da função pulmonar, sendo a sua aplicabilidade individual controversa.⁴⁶⁶⁻⁴⁷³

Não é possível efectuar nos lactentes estudos da função respiratória semelhantes aos realizados em crianças mais velhas, uma vez que não podem colaborar na realização de manobras respiratórias activas.

Os grandes grupos de lactentes com problemas respiratórios são aqueles com doença crónica da prematuridade ou insuficiência respiratória no período neonatal, que podem ter uma combinação de doença obstrutiva e restritiva, e as crianças com doença obstrutiva como a fibrose quística ou a sibilância recorrente (que afecta até 40% dos lactentes no 1º ano de vida).⁴⁶⁶

O interesse do estudo da função respiratória do lactente na comunidade internacional tem sido muito grande uma vez que a origem das doenças respiratórias em idade adulta reside na infância. Está claramente demonstrado por inúmeros estudos que existe um padrão constante de função pulmonar desde as primeiras semanas de vida que se mantém durante a infância,^{9,474} a idade escolar⁴⁷⁵⁻⁴⁷⁷ e mesmo até à idade adulta.^{14,15,478} Por outro lado, graças aos avanços médicos recentes será possível garantir a sobrevivência de grandes prematuros que terão provavelmente patologia pulmonar, sendo inclusivamente pertinente conhecer os efeitos nefastos de manobras interventivas ventilatórias no período neonatal na função pulmonar.

Estes estudos melhoraram o conhecimento referente aos efeitos adversos da exposição pré e pós natal ao fumo do tabaco, bem como a história natural das doenças pulmonares anteriormente nomeadas.

De referir que a alteração dos parâmetros funcionais respiratórios antes do aparecimento de qualquer manifestação respiratória^{9,27,34,474,479-482} encontra-se associada a um maior risco de sibilância nos primeiros anos de vida, pelo que o seu estudo precoce poderia ser uma importante mais-valia.

1.5.1. Fisiologia Respiratória do Lactente

O lactente apresenta peculiaridades fisiológicas em relação às crianças mais velhas, uma vez que a parede torácica apresenta uma elevada *compliance* resultando numa pressão transpulmonar diminuída.⁴⁸³ Para tentar evitar as potenciais dificuldades impostas pela elevada *compliance* da parede torácica, o lactente mantém o volume pulmonar através da elevação dinâmica do nível de final da expiração (*end expiratory level - EEL*), iniciando a inspiração antes de atingir a Capacidade Residual Funcional (*Functional Residual Capacity - FRC*), que traduz o volume de ar que fica no pulmão após uma expiração normal.

Por outro lado, a diminuição da pressão de tracção elástica resulta numa tendência para a oclusão das pequenas vias aéreas periféricas no final da expiração, o que em conjunto com o reduzido diâmetro das mesmas se traduz numa elevada susceptibilidade destas crianças para a obstrução das vias aéreas e sibilância, com compromisso do balanço ventilação-perfusão.

Refira-se que os lactentes com dificuldade respiratória têm uma grande fadiga determinada pela ineficácia da parede torácica, de elevada *compliance*, para vencer a pressão negativa pleural⁴⁸⁴ e pelo reduzido número de fibras músculo-esquelético tipo I nesta faixa etária.^{485,486}

Por último deve salientar-se que a resistência nasal é responsável por 50% da resistência total das vias aéreas, independentemente da faixa etária. No lactente a resistência nasal reveste-se de particular importância uma vez que a sua respiração é preferencialmente nasal, devendo este facto ser tido em conta na interpretação dos exames funcionais respiratórios.

1.5.2. Particularidades dos exames funcionais respiratórios no lactente

As particularidades de desenvolvimento fisiológico dos lactentes têm um grande impacto nas medições e interpretação dos resultados da função respiratória.

Efectuar provas de função respiratória a crianças com idade inferior a 2 anos de idade implica cuidados especiais com postura, sedação, respiração preferencialmente

nasal^{487,488} e por fim peculiaridades éticas, sendo necessário solicitar consentimento informado aos tutores legais.

Estas técnicas dependem apenas de manobras passivas, são muito complexas, muito dispendiosas e exigem especialistas altamente treinados para a sua realização, pelo que se encontram limitadas a laboratórios especializados.

Ao contrário das crianças mais velhas, estes exames são realizados com o lactente em decúbito dorsal, com a cabeça em posição mediana e extensão do pescoço para permitir patência das vias aéreas, sendo efectuados registos em períodos de sono profundo e relaxado, com padrão respiratório regular,⁴⁸⁹ utilizando-se máscara facial. O sono é induzido por sedação, à excepção dos recém-nascidos, em que os exames se efectuam durante o sono natural.

Outra dificuldade relaciona-se com a sua morosidade, demorando em média 2 a 3 horas, enquanto no adulto e na criança mais velha demora 30 minutos. Por outro lado, é mandatória a ausência de intercorrências infecciosas nas 2 a 3 semanas previamente à sua realização, para assegurar a inexistência de alterações funcionais decorrentes das mesmas.

Por todas as razões invocadas, particularmente a necessidade de sedação, muitas vezes os pais não permitem a realização destes exames, sendo reportado nos estudos internacionais uma taxa de participação de 25%.^{27,490,491}

1.5.3. Provas de função respiratória e aplicações

Nas crianças com idade inferior a 2 anos, excluindo o período neonatal, a grande maioria dos problemas respiratórios, quer de natureza transitória, quer persistente, traduz-se por sibilância recorrente. A necessidade de medição da resistência das vias aéreas e do sistema respiratório e de volumes e débitos expiratórios forçados, traduz a necessidade de compreender a etiopatogenia da sibilância.

A avaliação da função respiratória pode ser efectuada com o objectivo de determinar diferentes parâmetros, através de diversas técnicas que em seguida se descrevem.

a) Medições em Volume Corrente

As medições em volume corrente (volume de ar mobilizado num ciclo respiratório: inspiração e expiração) permitem uma avaliação do padrão expiratório e inspiratório, constituindo um método quantitativo para avaliação funcional das vias aéreas inferiores.⁴⁹²

São analisados diversos parâmetros que podem traduzir a existência de obstrução das vias aéreas, tais como o prolongamento do tempo para atingir o débito expiratório máximo instantâneo obtido numa expiração (t_{PEF}), o prolongamento do tempo expiratório (t_E) e a razão entre eles (t_{PEF}/t_E).

Desde a década de 40 que surgem descrições sobre a possível utilidade clínica da avaliação dos parâmetros em volume corrente em crianças com asma e fibrose quística.⁴⁹³

Têm sido apresentados desde então, na literatura internacional, diversos estudos que documentam a importância destes parâmetros, particularmente a razão t_{PEF}/t_E , uma vez que esta reflecte indirectamente o calibre das vias aéreas. Esta razão é inferior nas crianças com displasia broncopulmonar,⁴⁹⁴ em crianças do sexo masculino que posteriormente desenvolveram quadros de sibilância recorrente^{490,495} e ainda em crianças expostas a tabagismo materno durante a gravidez,^{496,497} comparativamente à obtida nos controlos saudáveis.

Tem sido demonstrado que crianças assintomáticas com evidência de obstrução na curva débito-volume em volume corrente nos primeiros dias de vida têm uma maior incidência de asma aos 2 anos⁴⁸¹ e aos 10 anos de idade.⁴⁹⁸

Dada a grande variabilidade intra e inter-sujeito destas medições, bem como a rápida mudança de padrão ventilatório, são necessárias várias medições de ciclos respiratórios em sono profundo para obter medições fiáveis.

Apesar da panóplia de estudos referenciados na literatura sobre estas medições, a relação entre estas e a mecânica ventilatória permanece pouco esclarecida.

b) Volumes Pulmonares

b.1) Técnicas de Diluição de Gases

As técnicas de diluição de gases (lavagem de azoto,⁴⁹⁹⁻⁵⁰⁴ diluição de hélio e lavagem por múltiplas respirações com mistura de gases inertes, denominada *Multiple Breath Washout* (MBW)^{505,506} – hexafluorido SF₆; hélio He; oxigénio O₂; nitrogénio N₂), permitem determinar a capacidade residual funcional (*Functional residual capacity* - FRC), que é o único volume passível de se medir com exactidão antes dos 3 anos de idade, traduzindo o volume de ar que fica nos pulmões após uma expiração normal.

As técnicas de diluição de gases têm a grande vantagem do equipamento ser portátil podendo ser aplicadas em Unidades de Cuidados Intensivos.

A técnica de MBW é mais sensível para as detecções precoces de anomalias da função pulmonar em crianças com fibrose quística do que as técnicas de compressão torácica que serão descritas posteriormente.^{506,507}

b.2) Pletismografia corporal

No pletismógrafo *baby*, como as medições se efectuam numa caixa fechada, é possível calcular a FRC, uma vez que pela Lei de Boyle a razão $P \times V$ é constante, as variações de pressão medidas na boca permitem calcular variações de volume.

A FRC medida com técnicas de diluição deve ser sobreponível à medida em pletismografia, no indivíduo saudável. No caso de existir obstrução das vias aéreas, a pletismografia sobrestima a FRC, uma vez que mede todo o ar dentro do pulmão enquanto que as técnicas de diluição de gases a subestimam, pois só medem o ar mobilizado, sendo impossível determinar o ar que fica encarcerado pela obstrução. Como tal, a diferença de valor obtido pelos dois métodos traduz o fenómeno de “*air trapping*”.^{508,509}

c) Resistência das vias aéreas

c.1) Manometria esofágica

Esta é uma técnica invasiva⁵¹⁰ pelo que entrou em desuso nesta faixa etária. Consiste na introdução de um catéter esofágico com um balão que vai determinar a resistência pulmonar dinâmica (R_L) - (parênquima e vias aéreas) e a *compliance* (distensibilidade pulmonar) - (C_L).

Tem sido substituída pelas técnicas de oclusão, com excepção das crianças ventiladas ou pré-termo, alimentadas por sonda nasogástrica.⁴⁶⁶

c.2) Oscilometria

A oscilometria forçada é uma técnica para avaliação dinâmica da mecânica ventilatória, que consiste na aplicação de frequências crescentes ao sistema respiratório, através de um microfone e utilizando uma máscara, não sendo invasiva e não exigindo colaboração.⁵¹¹⁻⁵¹⁵

Existe alguma controvérsia sobre o facto de se medir a resistência total do sistema respiratório (R_{rs}) ou a resistência das vias aéreas (R_{aw}).

De facto, a aplicação de baixas frequências (1-2Hz)⁵¹⁶ reflecte o comportamento do parênquima pulmonar enquanto que altas frequências (> 5-10Hz)^{517,518} reflectem as vias de condução. Para alguns autores a aplicação de frequências muito altas (>100Hz) pode traduzir a mecânica da parede das vias aéreas e a resistência das pequenas vias aéreas, podendo ser útil na avaliação de crianças com sibilância.^{519,520}

c.3) Técnicas de oclusão

Os métodos de oclusão são simples e rápidos, utilizando uma máscara facial, uma válvula de encerramento electrónico e um pneumotacógrafo.

Permitem medições da mecânica ventilatória passiva, baseando-se no facto de que o reflexo de insuflação de Hering-Breuer está presente em lactentes, sendo desencadeado durante oclusões breves das vias aéreas.⁵²¹ Ao efectuar-se a oclusão, ocorre um equilíbrio de pressão, reflectindo a pressão das vias aéreas a pressão de tracção elástica

estática do sistema respiratório.⁵²² As diferenças de pressão medidas na boca durante a oclusão das vias aéreas no final da inspiração permitem o cálculo da resistência do sistema respiratório.⁵²³

A técnica de oclusões múltiplas (MOT) e a técnica da respiração única (SBT) são actualmente as mais usadas, podendo ser aplicadas a lactentes em respiração espontânea ou entubados.^{524,525}

As medições da mecânica ventilatória passiva partem dos pressupostos de existência de equilíbrio de pressão no sistema respiratório durante a oclusão,⁵²² da ocorrência de completo relaxamento dos músculos respiratórios, com a libertação da oclusão, permitindo uma expiração passiva, e ainda do pressuposto que o sistema respiratório pode ser definido como tendo um tempo constante na expiração.⁵²⁶ Estes pressupostos são no entanto altamente frágeis nas crianças com doenças respiratórias, porquanto têm elevadas resistências, elevadas frequências respiratórias e atraso no esvaziamento pulmonar em algumas áreas pulmonares, não permitindo a existência de equilíbrio de pressão em todo o sistema respiratório.

Embora alguns estudos tenham sugerido que a mecânica ventilatória pode ser preditiva da subsequente doença crónica da prematuridade,^{527,528} estes factos não foram comprovados em estudos randomizados.⁵²⁹

O conhecimento da função dos músculos respiratórios pode ter aplicação prática na escolha da altura certa para retirar um lactente do ventilador ou para avaliar a recuperação pós-infecção aguda, pela avaliação das pressões inspiratórias máximas e mínimas após oclusão.^{486,530}

d) Débitos Expiratórios

Nas crianças e adultos mais velhos a avaliação espirométrica baseia-se na capacidade de atingir a limitação do débito expiratório a partir da capacidade pulmonar total (volume de ar que fica nos pulmões após uma inspiração máxima), realizando-se manobras forçadas expiratórias máximas.

As manobras expiratórias forçadas permitem obter curvas débito-volume cuja avaliação se torna particularmente útil no doente com patologia pulmonar obstrutiva.

Pela sua avaliação podemos obter parâmetros que reflectem a função das vias aéreas centrais: volume de ar expirado no primeiro segundo (*Forced Expiratory Volume* - FEV₁) e parâmetros que traduzem uma obstrução das vias aéreas mais periféricas: débitos expiratórios máximos do final da expiração.⁴⁶⁵ Os últimos são obtidos a partir da porção final da curva débito-volume, que é independente do esforço.

Durante uma manobra expiratória máxima forçada a partir da capacidade pulmonar total (*Total Lung Capacity* - TLC), o débito expiratório é independente da pressão exercida durante a capacidade vital forçada (FVC) a partir do momento em que se atinge uma pressão de equilíbrio em relação à capacidade de recolha elástica do pulmão e às propriedades mecânicas da parede torácica, atingindo-se a limitação do débito expiratório.

Deste modo, enquanto que a FVC é um indicador de volume, os volumes expirados FEV_t reflectem a função das vias aéreas centrais e as medições de débitos (volume de ar expirado por unidade de tempo) em diferentes pontos da FVC (FEF%), traduzem o calibre das vias aéreas enquanto o ar é expelido, não dependendo do esforço mas apenas da resistência das vias aéreas intratorácicas.^{531,532}

Recentemente tem sido questionada a importância dos débitos médios expiratórios no final da curva débito-volume (FEF₇₅) como indicador da função das vias aéreas periféricas, uma vez que a limitação do débito expiratório depende para além da resistência da parede das vias aéreas, da sua própria *compliance*. Deste modo, não é possível atribuir diferentes porções da curva débito-volume a regiões anatómicas específicas, devendo esta curva ser entendida como reflectindo o sistema respiratório num todo.⁵³³

O conceito de limitação do débito expiratório é comumente aceite, estando descritas três teorias que explicitam este conceito: a teoria dos pontos de equilíbrio de pressão ou *equal pressure point* (EEP),⁵³⁴ a teoria de Starling⁵³⁵ e a teoria de “*choke point*”.⁵³⁶

Segundo a teoria dos pontos de equilíbrio, durante a inspiração, as pressões intra-pleural e alveolar tornam-se cada vez mais negativas à medida que o volume pulmonar aumenta, resultando no aumento correspondente da pressão transmural, que contribui para a distensão da via aérea. No final da inspiração, pela interdependência mecânica

das vias aéreas e do parênquima pulmonar, o pulmão distendido a grande volume mantém também as vias distendidas. Durante a expiração passiva, a pressão alveolar (Palv), que representa a soma da pressão elástica de recolha do pulmão (PL) e da pressão pleural (Ppl), fornece a pressão necessária para que haja um fluxo de ar ao longo das vias aéreas até à boca, onde a pressão se aproxima da pressão atmosférica. Durante a expiração forçada, a queda da pressão transmural com a diminuição do volume pulmonar condiciona o estreitamento das vias aéreas. As pressões intraluminal e extraluminal (ou pleural) equilibram-se em determinados locais ao longo das vias aéreas intratorácicas, designados por pontos de equilíbrio de pressão ou *equal pressure points* (EPP), ocorrendo limitação do débito expiratório.

A teoria de Starling deriva dos princípios físicos que explicitam a existência de fluxo sanguíneo, segundo a qual a pressão que origina um débito expiratório máximo é a diferença entre a pressão alveolar e a pressão crítica transmural. À medida que existe débito expiratório, a pressão transmural vai, num dado ponto, exceder a pressão necessária para manter esse débito, ocorrendo o colapso da via aérea, que limita o débito.⁵³⁵ Esta teoria partilha os mesmos conceitos teóricos da descrita anteriormente.^{531,532}

Por fim, a teoria de “*choke point*” postula que a árvore traqueobrônquica é incapaz de acomodar mais rapidamente um fluxo de ar do que a velocidade com que as pressões se podem propagar ao longo das vias aéreas.⁵³⁶

A tendência com que a pressão extraluminal tem de comprimir a via aérea é oposta à rigidez da parede da via aérea. À medida que o volume de pulmão diminui durante a expiração, o calibre das vias aéreas diminui e a sua *compliance* aumenta, ambas conduzindo à diminuição do débito. Quando a pressão extraluminal excede a pressão intraluminal, a via aérea tenderá a estreitar-se funcionando como um “*choke point*” que limita o débito.

Para a realização de manobras expiratórias forçadas máximas é necessário efectuar um esforço expiratório considerável e mantido, até ao volume residual, o que se torna impossível de realizar por um lactente.

Para a obtenção de débitos expiratórios forçados no lactente é utilizado um equipamento da técnica de compressão torácica rápida, através de um colete insuflável que se aplica no tórax da criança, comprimindo momentaneamente o mesmo no final da inspiração, permitindo mimetizar uma expiração forçada.

d.1) Técnica da compressão torácica rápida em volume corrente (RTC)

A técnica de compressão rápida torácica foi o primeiro método não invasivo a ser utilizado em lactentes saudáveis e com doença pulmonar.

Esta técnica pretende avaliar a função das vias aéreas alcançando a limitação do débito expiratório, sendo considerada uma medição do débito expiratório parcial, uma vez que todos os registos são efectuadas em volume corrente.

São aplicadas pressões crescentes no colete (2-12kPa), através da insuflação de um saco distensível que se encontra no seu interior, até se obterem curvas débito-volume parciais (RTC) em que se evidencia a ocorrência de limitação do débito expiratório, documentando-se o débito máximo à FRC ($V'_{\max\text{FRC}}$), que reflecte a função das vias aéreas inferiores⁵³⁷⁻⁵³⁹ nos locais a montante da obstrução. Uma vez que é calculado quando ocorre limitação do débito expiratório, é independente do esforço e da resistência das vias aéreas superiores,⁵⁴⁰ o que se torna particularmente relevante uma vez que a resistência nasal constitui 50% da resistência total do sistema e os lactentes são respiradores nasais.^{541,542}

Nos estudos iniciais desta técnica foi documentada a existência de uma grande variabilidade intra e inter sujeito nas medições do $V'_{\max\text{FRC}}$,^{538,543-545} sendo desde então recomendado nas orientações internacionais a análise atenta das curvas débito-volume obtidas de modo a aumentar a sensibilidade das mesmas, em detrimento da análise isolada dos valores de $V'_{\max\text{FRC}}$.⁵⁴⁶

Le Souëf e colaboradores⁵⁴⁶ descreveram a existência de curvas convexas em crianças saudáveis e curvas côncavas em lactentes com patologia respiratória obstrutiva (Figura 4). Para além disso, os lactentes com limitação do débito expiratório, em que a aplicação de pressões crescentes de compressão torácica não conduzem ao aumento do débito, têm uma doença das vias aéreas de maior gravidade do que aqueles que não apresentam esta limitação.

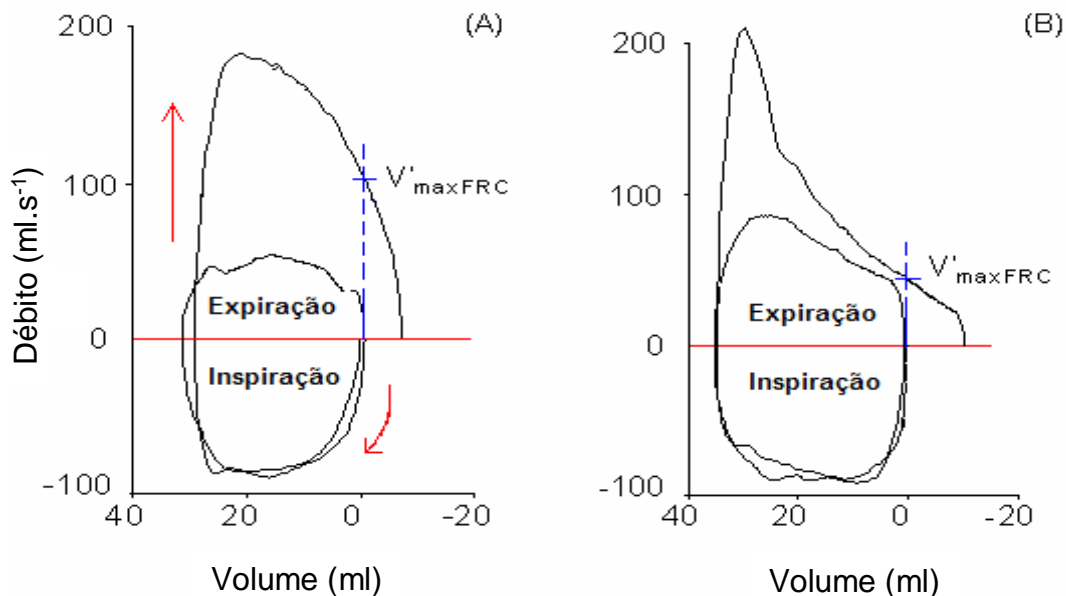


Figura 4 - Curvas débito-volume de criança saudável (A) e criança com obstrução das vias aéreas (B).

Esta técnica foi posteriormente normalizada pela *Task Force* conjunta da *American Thoracic Society* (ATS) e *European Respiratory Society* (ERS),⁵⁴⁷ o que permite a comparação de resultados entre centros diferentes.

Uma das grandes limitações desta técnica reside no facto de que os débitos expiratórios forçados são obtidos à FRC, que é variável de acordo com o padrão de volume corrente, padrão de sono e com a obstrução das vias aéreas.^{546,548} Este facto condiciona significativamente a variabilidade do $V'_{\max FRC}$ intra e inter-sujeito, com coeficientes de variação de 15 e 50%, respectivamente,^{538,545} sendo este problema ultrapassado com a técnica de compressão rápida torácica em volumes aumentados, que será descrita posteriormente.

Tem sido demonstrada uma diminuição da $V'_{\max FRC}$ em crianças com sibilância recorrente,^{9,549} bronquiolite⁵²² e traqueomalácia.⁵⁵⁰

Alguns estudos demonstraram ainda diminuição da função pulmonar em crianças com fibrose quística, mesmo na ausência de infecções respiratórias reconhecidas

clínicamente,⁵⁵¹ com recuperação durante a infância,^{552,553} o que pode ter implicações fulcrais na instituição de terapêutica precoce.

No caso da sibilância recorrente, o primeiro estudo prospectivo para avaliação da história natural da asma com inclusão de estudos funcionais respiratórios foi efectuado por Martinez e colaboradores. Estes concluíram que a diminuição da função pulmonar precede a sibilância transitória, sendo no período neonatal a razão t_{PEF}/t_E significativamente baixa em rapazes que desenvolveram infecções respiratórias no primeiro ano de vida, bem como a diminuição do V'_{maxFRC} no mesmo período nas crianças com sibilância no primeiro ano e pelo menos outro episódio aos 3 anos de idade.^{9,490}

Foram encontrados resultados semelhantes num outro estudo americano⁵⁵⁴ e num estudo britânico foi comprovado o aumento das resistências precocemente em crianças com sibilância no 1º ano de vida.²⁶

Wilson e colaboradores não encontraram qualquer associação entre sibilância persistente após os 4 anos de idade e a redução do V'_{maxFRC} no primeiro mês de vida.⁴⁵⁷

No entanto, no estudo australiano efectuado por Le Soeuf e colaboradores, foi demonstrado que a redução da função pulmonar precocemente na vida estaria associada a sibilância persistente aos 11 anos de idade.^{34,477} Também neste sentido foi documentado por Delacourt e colaboradores que as crianças com sibilância persistente apresentavam uma diminuição do V'_{maxFRC} aos 17 meses de idade em relação às crianças com sibilância transitória.⁵⁵⁵

Murray e colaboradores demonstraram que uma diminuição do V'_{maxFRC} no primeiro mês de vida seria um factor de risco para sibilância persistente posteriormente na vida.⁴⁸⁰

Estas discrepâncias poderão dever-se a diferenças metodológicas, devendo realçar-se que o estudo de Martinez e colaboradores (estudo de Tucson) contemplou a realização de estudos de função respiratória em apenas 10% das crianças incluídas no estudo.

d.2) Técnica da compressão torácica rápida em volume aumentado (RVRTC)

Para se obter uma curva débito-volume completa (RVRTC), mimetizando uma espirometria, é necessário proceder a 2-3 manobras de insuflação, no final da inspiração, previamente à compressão torácica. Estas insuflações são efectuadas pelo operador, através da oclusão das vias aéreas, com um tubo em T ligado a um ventilador Neopuff, calibrado para a aplicação de uma pressão de 30cm H₂O.

A compressão torácica é comandada pelo operador, ao contrário da técnica RTC em que esse processo é automático, sendo efectuada no final das manobras de oclusão das vias aéreas (final da inspiração). Nesta, a pressão aplicada no colete corresponde àquela em que se obteve o débito máximo à FRC ($V'_{\max FRC}$).

Deste modo, é possível produzirem-se curvas débito-volume parciais ou débitos máximos a FRC (RTC- $V'_{\max FRC}$) e débitos após insuflação (RVRTC).^{539,556-558}

Após uma inspiração máxima até TLC, o volume do gás exalado durante a expiração máxima subsequente até ao volume residual designa-se capacidade vital forçada ou FVC. No entanto, no lactente, o volume máximo do pulmão pode não ser atingido, caso não sejam efectuadas correctamente as manobras de insuflação prévias à compressão. Por esta razão, o parâmetro correcto deveria ser FVC_p, em que p designa a pressão da insuflação que se aplicou. No entanto, designa-se usualmente somente por FVC porquanto se pressupõe traduzir FVC₃₀, para denotar a aplicação de uma pressão de insuflação de 30 cmH₂O ou de 3 kPa.

Como o volume pulmonar é determinado pela pressão de insuflação, esta técnica não vai ser condicionada pelas variações da FRC, tal como sucedia na técnica RTC.

Quanto aos volumes expirados por unidade de tempo (FEV_t), no lactente, devido ao esvaziamento rápido pulmonar (vias aéreas relativamente grandes em relação ao volume do pulmão), as manobras expiratórias duram menos do que um segundo, pelo que só é possível reportar FEV_{0.5} ou FEV_{0.75}.

Vários estudos têm documentado que a técnica RVRTC é mais sensível que a técnica RTC na identificação de diferenças na função pulmonar periférica em lactentes com e sem doença pulmonar,⁵⁵⁹⁻⁵⁶⁵ nomeadamente com sibilância recorrente,^{564,566} devendo

salientar-se que é muito mais complexa de aplicar e que as recomendações para a sua aplicação e colheita de dados são escassas.^{567,568}

1.5.4. Factores que influenciam a função e desenvolvimento pulmonar na infância

Sexo

Vários estudos de função respiratória têm demonstrado que as crianças do sexo feminino apresentam um calibre das vias aéreas superior às crianças do sexo masculino, traduzindo-se por débitos elevados em relação ao pulmão e massa corporal, desde lactentes^{481,490,491,544} até à puberdade.^{569,570} Este pode mesmo ser o factor explicativo para a maior prevalência de sibilância e asma no lactente^{9,26,27} e na criança do sexo masculino.^{9,571}

Por outro lado, foi comprovado que no sexo masculino o tónus em repouso das vias aéreas é superior ao do sexo feminino, sendo imutável com a inspiração profunda e administração de isoproterenol.⁵⁷²

Foi inclusivamente equacionado que a maturação pulmonar *in utero* é mais eficiente na rapariga do que no rapaz, com as consequentes implicações após o nascimento. Estas diferenças foram traduzidas por um maior número dos movimentos bucais, que constituem marcadores da respiração fetal^{573,574} e consequentemente do desenvolvimento pulmonar fetal, e ainda um melhor perfil fosfolipídico, determinante para a produção de surfactante pulmonar,⁵⁷⁵ nos fetos do sexo feminino.

Durante a adolescência, tem sido documentado um crescimento das vias aéreas no sexo masculino,^{576,577} que pode explicar a melhoria clínica em relação à doença respiratória à medida que se tornam adultos, comparativamente com o que ocorre no sexo feminino.^{481,546,570,578} No entanto, foi comprovado que os doentes asmáticos do sexo masculino têm o dobro da probabilidade de virem a ter remodelação das vias aéreas aos 18 anos de idade,⁵⁷⁹ com uma diminuição da razão FEV₁/FVC aos 26 anos de idade.¹⁴

Estas diferenças biológicas implicam algum cuidado na comparação dos valores de função respiratória entre os dois sexos.

Raça

Vários estudos internacionais têm documentado diferenças no padrão respiratório e mecânica ventilatória nas crianças de raça negra em relação à caucasiana, traduzidas pela existência, nas primeiras, de uma menor resistência das vias aéreas,⁵⁴² menor frequência respiratória, tempo expiratório mais prolongado,^{491,580} maiores débitos máximos à FRC ($V'_{\max FRC}$)^{491,580} e uma maior *compliance* do sistema respiratório.^{491,580}

Crescimento intra-uterino

O atraso de crescimento intra-uterino (ACIU) está associado a prematuridade, morte *in utero* e diminuição da reserva fetal durante o parto.^{481,546,578,581-583} A exposição ambiental ao fumo de tabaco é o factor mais determinante no peso ao nascer,⁵⁸⁴ sendo responsável por uma redução média de 150 a 300 gramas do peso à nascença.^{585,586} O tabagismo materno tem maior importância, estando no entanto também o tabagismo paterno associado a baixo peso ao nascer.⁵⁸⁷

O baixo peso ao nascer, inferior ao percentil 10 para a idade gestacional, está associado a um elevado risco de mortalidade e morbidade perinatal.⁵⁸⁸⁻⁵⁹⁰

Os lactentes com baixo peso para a idade gestacional têm maior probabilidade de admissão hospitalar por infecções respiratórias,⁵⁹¹ estando este facto associado ao tabagismo durante a gravidez.⁵⁹² O baixo peso ao nascer também está associado a maior probabilidade de sibilância nas crianças até aos 5 anos de idade⁵⁹³ e diminuição da função pulmonar.⁵⁹⁴

Tabagismo activo durante a gravidez

Os efeitos nocivos da exposição tabágica *in utero* têm sido largamente estudados, sendo conhecido o seu efeito deletério no desenvolvimento e crescimento somático e ainda na função respiratória.^{30,580,595} A exposição tabágica pré-natal está associada a hipóxia crónica e baixo peso para a idade gestacional.

Durante a gravidez, o monóxido de carbono do plasma materno atravessa a placenta, com concentrações fetais que são 15% superiores à materna, constituindo um risco para

o feto uma vez que a hemoglobina fetal tem maior afinidade para o monóxido de carbono que a hemoglobina do adulto.

O principal metabolito da nicotina chama-se cotinina, tem uma semi-vida de 14 a 24 horas e é frequentemente utilizada para indicar um índice de exposição à nicotina.⁵⁹⁶⁻⁶⁰³ Valores de cotinina urinária superiores a 50ng/ml são sugestivos de forte exposição passiva ao fumo do tabaco, provavelmente materna ou de alguém que conviva mais proximamente com a criança, enquanto que valores entre 25-50ng/ml são sugestivos de exposição embora menos acentuada.

Existe uma forte associação entre o tabagismo materno durante a gravidez e a mortalidade e morbidade fetal e neonatal, com comprometimento do desenvolvimento pulmonar e até mesmo do ganho ponderal.³⁰

A exposição ao fumo do tabaco *in utero* condiciona o desenvolvimento pulmonar e das vias aéreas, por alterações estruturais⁶⁰⁴ e por alterações do sistema imune.⁶⁰⁵

Também se encontra documentada a associação entre tabagismo materno durante gravidez e diminuição da função pulmonar no período neonatal.³⁰

História familiar de asma

Estudos de função respiratória demonstraram que os lactentes saudáveis com história familiar de asma apresentavam um aumento da resistência específica das vias aéreas e da razão t_{PEF}/t_E , às 8 semanas e ao primeiro ano de vida, apresentando um risco de episódios de sibilância significativamente superior às crianças saudáveis sem história familiar de asma.²⁷

No estudo de Perth, foi documentado uma hipersusceptibilidade brônquica aumentada entre as 2 e as 10 semanas de vida nas crianças com história familiar de asma.⁶⁰⁶ No estudo de seguimento destas crianças, a reactividade brônquica aumentada ao 1º ano de vida estava associada a um risco acrescido de diagnóstico de asma e diminuição de FEV₁ e FEF₂₅₋₇₅ aos 6 anos, sendo este risco ainda maior aos 11 anos de vida.⁶⁰⁷ Noutro estudo efectuado em Londres, a história materna de asma estava associada a diminuição de V' _{maxFRC}.⁶⁰⁸

1.6. Objectivos e hipóteses do estudo

Uma vez que a sibilância recorrente surge como uma entidade comum na prática clínica diária, podendo constituir a primeira manifestação de asma brônquica nalgumas crianças, seria particularmente interessante dispor de ferramentas auxiliares de diagnóstico que permitissem a identificação precoce de crianças com risco acrescido para asma, de modo a justificar atitudes terapêuticas e de seguimento adequadas.

Foi recrutado um grupo estudo de crianças com quadro de sibilância recorrente e um grupo controlo de crianças saudáveis. As crianças do grupo de estudo foram classificadas como tendo um alto ou baixo risco para asma de acordo com o índice preditivo publicado por Castro Rodriguez e colaboradores.⁴⁴

O objectivo principal deste estudo consistiu na avaliação funcional respiratória destas crianças de modo a inferir se as crianças de alto risco de asma brônquica se poderiam distinguir das crianças de baixo risco, através das provas funcionais respiratórias, bem como avaliar as diferenças entre as crianças sibilantes e as crianças saudáveis.

Neste âmbito, foi também propósito deste estudo a elaboração de um protocolo de investigação em colaboração e sob a supervisão de investigadores do *Portex Department of Anaesthesia Intensive Therapy and Respiratory Medicine* do *Great Ormond Street Hospital for Sick Children* em Londres, permitindo a validação do laboratório de avaliação funcional respiratória do lactente do Serviço de Imunoalergologia do Hospital do Dona Estefânia, em Lisboa.

Constituíram também objectivos deste estudo o doseamento de IgE total, o estudo do perfil imunológico Th₁ e Th₂ (pela avaliação da expressão de citocinas), a quantificação de populações de células reguladoras e ainda o estudo de polimorfismos genéticos, de modo a verificar se algum destes parâmetros poderia ser utilizado para destrinçar os subgrupos de crianças sibilantes, bem como as crianças sibilantes das saudáveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Recrutamento da população em estudo

A população alvo deste estudo foram crianças com sibilância recorrente recrutadas no Serviço de Urgência do Hospital de Dona Estefânia (grupo estudo) e crianças seguidas em Otorrinolaringologia, Cirurgia ou nos Centros de Saúde (grupo controlo) adstritos ao Hospital de Dona Estefânia. Foram admitidas para o estudo entre o início de Setembro de 2005 e o final de Setembro de 2007.

As crianças pertencentes ao grupo de estudo foram encaminhadas directamente pelos médicos do Serviço de Urgência para o Serviço de Imunoalergologia. Foram classificadas como alto risco ou baixo risco para asma brônquica através da utilização do índice preditivo para asma brônquica publicado por Castro Rodriguez e colaboradores.⁴⁴

Deste modo, foram incluídas no grupo de alto risco para asma as crianças com história parental de asma brônquica ou história pessoal de eczema atópico e as crianças com dois dos seguintes factores: eosinofilia periférica (definida como superior a 4%), história pessoal de rinite alérgica ou sibilância fora do contexto infeccioso.

As crianças do grupo controlo foram contactadas directamente pelo investigador principal quando recorreram ao Serviço de Otorrinolaringologia ou de Cirurgia ou encaminhadas para este directamente do Centro de Saúde.

Todas as crianças tiveram uma consulta de Imunoalergologia para clarificação dos critérios de inclusão e exclusão, esclarecimento do protocolo, obtenção de consentimento parental informado e inscrição na lista de marcações dos exames funcionais respiratórios.

No protocolo inicial deste estudo pretendia-se a inclusão de doentes e controlos saudáveis de Lisboa, mas devido a grandes dificuldades no recrutamento de controlos saudáveis, tornou-se imprescindível a inclusão de controlos de Londres (crianças saudáveis observadas no *Great Ormond Street Hospital for Sick Children*), a partir de estudos prospectivos epidemiológicos longitudinais.

2.1.1. Critérios de Inclusão

Para o grupo estudo foram incluídas crianças entre os 8 e os 20 meses, com mais de 3 episódios de crises de dificuldade respiratória baixa diagnosticadas por um médico, no ano transacto à inclusão e sem crises ou medicação nas três semanas prévias à realização do exame funcional respiratório. Todas as crianças admitidas para este estudo nunca foram medicadas com terapêutica inalada (corticosteróides ou broncodilatadores de longa acção) ou antileucotrienos. Em caso de crise foi prescrita medicação com broncodilatadores de curta acção e eventualmente corticosteróides orais no período máximo de 3 a 5 dias, de acordo com as orientações internacionais.⁶⁰⁹

O grupo controlo incluiu crianças do mesmo grupo etário, sem antecedentes de queixas respiratórias, sem história pessoal de doenças alérgicas e sem história parental de asma brônquica.

2.1.2. Critérios de Exclusão

Foram critérios de exclusão, a história de atraso de crescimento intra-uterino, baixo peso ao nascer (< P10), prematuridade (idade gestacional inferior a 37 semanas), história de reanimação neonatal e necessidade de ventilação, presença de outras doenças sistémicas com comprometimento da função respiratória (fibrose quística, doenças neuromusculares, doenças osteoarticulares, doenças metabólicas, doenças cardíacas), doenças gastrointestinais, hipersensibilidade ao hidrato de cloral, história de obstrução das vias aéreas superiores, roncopatia e internamentos anteriores.

2.2. Aprovação pelo Conselho de Ética

O presente estudo foi submetido aos Conselhos de Ética dos dois hospitais (Hospital de Dona Estefânia e *Great Ormond Street Hospital for Sick Children*), tendo sido aprovado em Julho de 2005.

2.3. Consentimento Informado

A participação no presente estudo foi determinada pela aprovação e consentimento escrito dos pais das crianças. Na consulta inicial de Imunoalergologia foi explicado aos pais de cada criança o projecto de investigação e seus objectivos, sendo informados dos

procedimentos para a realização da prova funcional respiratória e colheita de sangue e urina. Foi ainda efectuada uma visita à sala de função respiratória, de modo a explicitar correctamente os procedimentos e possibilitar uma visualização e familiarização com os equipamentos.

Após fornecimento de documento escrito explicitando todos os procedimentos, foi pedido, em caso de aceitação de participação no projecto, um documento identificativo e posterior consentimento por escrito para entrada no estudo. Foi explicado que poderiam sempre desistir ao longo da realização do mesmo, podendo a qualquer momento retirar a autorização de participação.

Os pais estiveram sempre presentes na realização da prova funcional respiratória, bem como na colheita de sangue e urina.

Independentemente da participação no estudo, todas as crianças sibilantes ficaram adstritas à Consulta de Imunoalergologia, com consultas periódicas agendadas à semelhança de todos os doentes seguidos usualmente na mesma.

2.4. Questionário

No sentido da caracterização adequada das crianças em estudo, foi preenchido, no dia da realização da prova funcional respiratória, um questionário após inquérito directo aos pais das crianças englobando questões sobre os antecedentes pessoais, antecedentes familiares, exposição tabágica, caracterização da doença actual, registo de alergia, hospitalizações prévias, história de roncopatia, doenças cardíacas, neurológicas ou osteoarticulares, medicação concomitante e condição clínica nas três semanas prévias à realização da prova de função respiratória.

2.4.1. Antecedentes Pessoais

Nos antecedentes pessoais foram registados todos os dados referentes à gestação (duração, seguimento, intercorrências), dados antropométricos ao nascimento, tipo de parto, local de nascimento, intercorrências durante o parto, evolução no período neonatal (necessidade de ventilação assistida, internamento, fototerapia), vacinação e alimentação no primeiro ano de vida.

No seguimento da colheita destes dados foram considerados relevantes todos os internamentos, cirurgias, acidentes e outras doenças na infância, particularmente alérgicas (eczema, rinite, alergias alimentares ou a fármacos).

2.4.2. Antecedentes Familiares

Nos antecedentes familiares indagou-se a existência de doenças alérgicas nos familiares de primeira linha (pais e irmãos), nomeadamente asma brônquica, rinite, eczema, alergias alimentares e medicamentosas.

Para esclarecimento de toda a história familiar foram registadas todas as doenças de carácter heredo-familiar, na família alargada dos progenitores da criança em estudo.

2.4.3. Exposição tabágica

Foram registados os hábitos tabágicos dos pais da criança, com particular ênfase materno, durante e após a gravidez. O consumo foi especificado em unidades maço por ano (UMA). No caso de convivência diária com outras pessoas no domicílio, foi especificado e quantificado o consumo tabágico.

2.5. Equipamento do Laboratório de Exploração Funcional Respiratória

2.5.1. Equipamento de monitorização e ressuscitação

Todos os exames de função respiratória foram efectuados sob monitorização de frequência cardíaca e saturação de oxigénio (*Space Labs Medical 1998 version 3.04*) com sonda extensível adaptada ao dedo indicador do pé da criança.

Do mesmo modo esteve sempre disponível todo o equipamento necessário para uma eventual reanimação cardio-respiratória, nomeadamente fonte de oxigénio com regulador de débito, insuflador auto-insuflável (ambu) com reservatório, equipamento de aspiração com cateteres de sucção e carro com equipamento eléctrico de reanimação, laringoscópio e tubos endotraqueais. Previamente à realização do exame preparou-se a medicação de emergência, nomeadamente adrenalina, atropina e hidrocortisona.

2.5.2. Equipamento para avaliação da função respiratória

Foi utilizado o equipamento *VYASYS Healthcare Masterscreen Babybody* (version 4.6, Hochberg, Alemanha), bem como o equipamento para manobras expiratórias forçadas em volume corrente e em volume aumentado que será descrito seguidamente.

Foram utilizadas máscaras (Figura 5) *Rendell Baker* tipo I ou II (*Rendall Baker Soucek* tamanho 1 ou 2, *Rusch Ltd*, High Wycombe, Reino Unido) consoante a idade do lactente e plasticina (*Sammons Preston*, Nottinghamshire, Reino Unido) para selar a máscara à face da criança, garantindo que não existiam fugas. A fim de garantir uma pequena extensão da cabeça e pescoço, bem como para suportar a cabeça da criança durante as medições, foram utilizados rolos de tecido e pequenos sacos de soro fisiológico.



Figura 5 - Máscaras Rendell-Baker

2.5.3. Equipamento para manobras expiratórias forçadas

Para serem adquiridos dados através de manobras forçadas foi necessário ter algum equipamento adicional. Foram utilizados coletes, de dois tamanhos, consoante a circunferência torácica da criança em estudo, fornecidos pela *VIASYS*. Dentro destes coletes foi colocada uma bolsa quadrangular de plástico distensível por aumentos de volume de ar no seu conteúdo, ligada a um tubo de vinil transparente estriado de cerca

de 1 metro de comprimento conectado na sua extremidade distal a um reservatório de 100 litros de capacidade de ar (Figura 6).



Figura 6 - Coletes adaptáveis ao tórax (à esquerda), bolsa distensível acoplada a tubo de vinil (ao centro), ligado a reservatório de ar, inserido no equipamento do pletismógrafo *baby* (à direita).

Para além do equipamento já mencionado, para a realização das manobras expiratórias em volume aumentado, foi ainda necessário um equipamento de pressão positiva de insuflação com uma válvula de escape de pressão - ventilador de pressão positiva (*Neopuff RD1000 Infant Resuscitator, Fisher and Paykel, Nova Zelândia*), ligado ao pneumotacógrafo através de um tubo de ventilação e um conector (Figura 7).

O ventilador foi programado para uma pressão fixa de 30 cmH₂O (3kPa), através da utilização de ar a 10-12 lmin⁻¹ que foi fornecido através de um tubo transparente de plástico, conectado a uma fonte de ar.

Durante as manobras expiratórias, esta pressão foi transmitida pelo *Neopuff* através de um tubo de plástico transparente semelhante a uma traqueia que se encontrava ligado a uma peça em T de látex com 22 mm de diâmetro (*Intersurgical, Reino Unido*). Enquanto que uma entrada estava conectada ao pneumotacógrafo, a outra encontrava-se livre para o operador poder efectuar oclusões intermitentes de modo a se obterem insuflações pulmonares.



Figura 7- Ventilador *Neopuff*

Como o *Neopuff* se encontrava ligado à fonte de ar, as manobras de insuflação foram efectuadas com visualização directa e controlável da pressão de saída do *Neopuff* de 3Kpa.

2.6. Provas funcionais respiratórias

2.6.1. Agendamento das provas funcionais respiratórias

No dia da primeira consulta no Serviço de Imunoalergologia foram explicados aos pais todos os procedimentos inerentes à realização da prova funcional respiratória e colheitas de amostras biológicas (sangue, urina).

Para a explicação do procedimento do exame de função respiratória, foi efectuada uma pequena simulação de um exame no Laboratório de Exploração Funcional Respiratória do Lactente.

No caso dos exames de função respiratória foi explicitada a necessidade da sua realização sob sedação com hidrato de cloral, tendo sempre em atenção na colheita cuidada da história clínica a inexistência de obstrução das vias aéreas superiores, roncopatia, episódios de cianose, episódios de apneia, dificuldade na deglutição,

patologia neurológica ou hipersensibilidade ao fármaco, que pudessem constituir contra-indicações absolutas para a sua utilização.

Após obtenção do consentimento informado para a participação no estudo, o agendamento das provas funcionais respiratórias foi efectuado telefonicamente de modo a garantir pelo menos 3 semanas de intervalo após um episódio de dificuldade respiratória ou infecção respiratória alta ou baixa.

De modo a facilitar a eficácia da sedação, os pais foram aconselhados a manter as crianças acordadas desde as 7 horas da manhã, mantendo também jejum absoluto por indicação da Anestesiologia, por motivos de segurança caso ocorresse algum efeito adverso e fosse necessário efectuar manobras de reanimação e eventual entubação oro-traqueal.

2.6.2. Preparação para o exame de função respiratória

Antes da realização do exame de função respiratória foi confirmada a presença e funcionalidade do equipamento de ressuscitação cardiopulmonar, equipamento de aspiração, oxímetro de pulso, bem como o equipamento funcional respiratório.

2.6.3. Oximetria de pulso

Antes da administração da sedação com hidrato de cloral foram sempre medidas e registadas a saturação de oxigénio e a frequência cardíaca. Durante todo o exame de função respiratória sob sedação estes parâmetros foram monitorizados continuamente através de um monitor (*Space Labs Medical 1998*, versão 3.04).

2.6.4. Medições antropométricas

Os valores previstos de função respiratória variam consoante o peso e o comprimento da criança. Neste sentido, foram efectuadas medições de peso, previamente à realização da prova de função respiratória através de uma balança digital (*Secca*, Reino Unido), sendo registado o peso em quilograma, à terceira casa decimal.⁴⁸⁹

O registo do comprimento foi efectuado após a prova, uma vez que a criança ainda se encontrava sonolenta permitindo efectuar uma correcta medição. Com a criança deitada,

foram efectuadas medições utilizando um estadiómetro (*Secca*, Reino Unido), por duas pessoas distintas. Os resultados foram registados em centímetros, à segunda casa decimal.⁴⁸⁹

Todos os valores obtidos foram convertidos em Z-scores utilizando as equações publicadas por Freeman e colaboradores.⁶¹⁰ Foram utilizadas estas equações para uniformizar a utilização de controlos saudáveis de Londres, bem como pela ausência de equações em Z-scores publicadas para a população portuguesa.

2.6.5 Protocolo de sedação

A sedação foi efectuada, sob jejum, utilizando uma única dose de hidrato de cloral (65 mg/kg) numa dose máxima de 1000mg, administrado por via oral.

Foi demonstrado que a administração de hidrato de cloral na dose de 50-75 mg/kg não afecta o reflexo Hering Breuer ou os parâmetros respiratórios nos lactentes.^{538,611,612} Após a realização da prova de função respiratória, as crianças ficaram em observação durante 2 horas, tendo alta apenas após conseguirem ingerir uma refeição ligeira, com sólidos e líquidos.

2.6.6 Aplicação da máscara facial

Para a realização das provas funcionais respiratórias, a criança em estudo foi colocada em posição supina com extensão do pescoço, utilizando-se para isso um rolo de tecido. Foi utilizada uma máscara facial adaptada à face da criança com o auxílio de plasticina colocada em todo o bordo inferior da mesma. Exteriormente à mesma foi reforçada, sempre que necessário, a sua adaptação com a colocação de mais plasticina.

2.6.7. Detecção e eliminação de fugas

Com o início da prova de função respiratória, tornou-se mandatório aguardar cerca de 5 a 8 ciclos respiratórios em volume corrente até se atingir estabilidade no nível do final da expiração ou EEL. Posteriormente foi necessário verificar a inexistência de fugas, que podem existir pela deficiente adaptação da máscara facial ou do pneumotacógrafo, o que acarreta a impossibilidade de utilização dos dados obtidos.

Para tal foi efectuada uma pequena oclusão das vias aéreas no final da inspiração, durante breves segundos, ficando excluída a existência de fuga caso o EEL voltasse à linha basal original após se libertar a oclusão, na ausência de débito e sem queda da pressão das vias aéreas (Pao).^{522,523}

As fugas foram facilmente reconhecidas e corrigidas pelo reposicionamento da máscara ou ajuste do pneumotacógrafo, confirmando-se a sua correcção com novo teste de oclusão.

Em seguida são esquematizados vários diagramas que traduzem um traçado satisfatório após oclusão (Figura 8), a presença de uma fuga com um *desvio* do traçado do volume (Figura 9), um traçado exemplificativo de fuga na máscara com *desvio* no eixo do volume após oclusão (Figura 10) e por fim um traçado que traduz fuga no pneumotacógrafo com "zero" no sinal após oclusão (Figura 11).

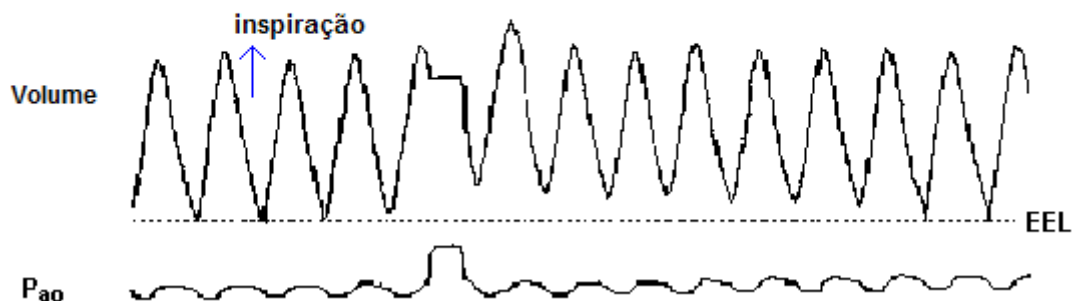


Figura 8 - Teste de oclusão satisfatório: estabilidade do EEL antes e após oclusão, sem queda de Pao e sem débito durante a oclusão, evidenciando ausência de fugas.

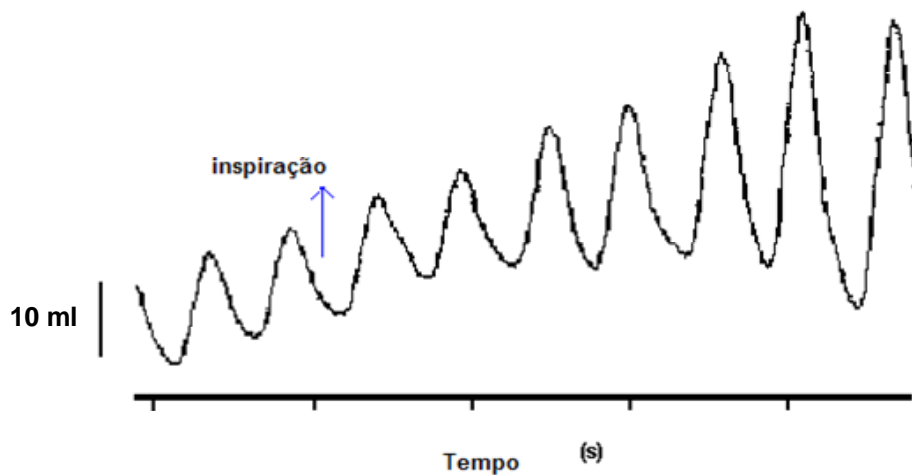


Figura 9 - Efeito de fuga na máscara durante medições em volume corrente, com diminuição do volume corrente e *desvio* ascendente do traçado de volume. No final do traçado verifica-se aumento do volume corrente após correção da fuga.

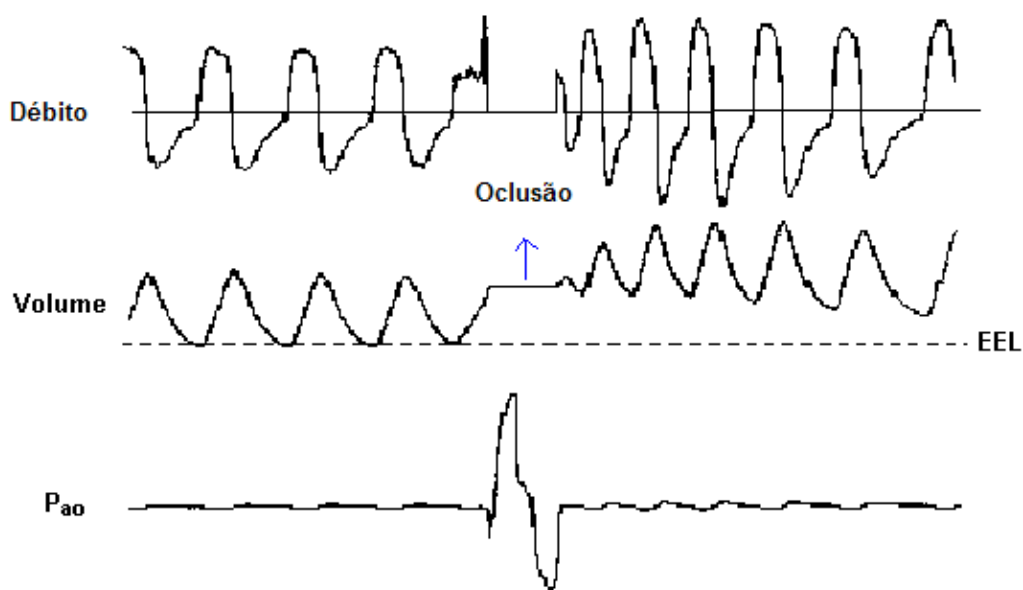


Figura 10 - Fuga na máscara facial, com evidente desvio ascendente do traçado após oclusão e queda da P_{ao} na oclusão.

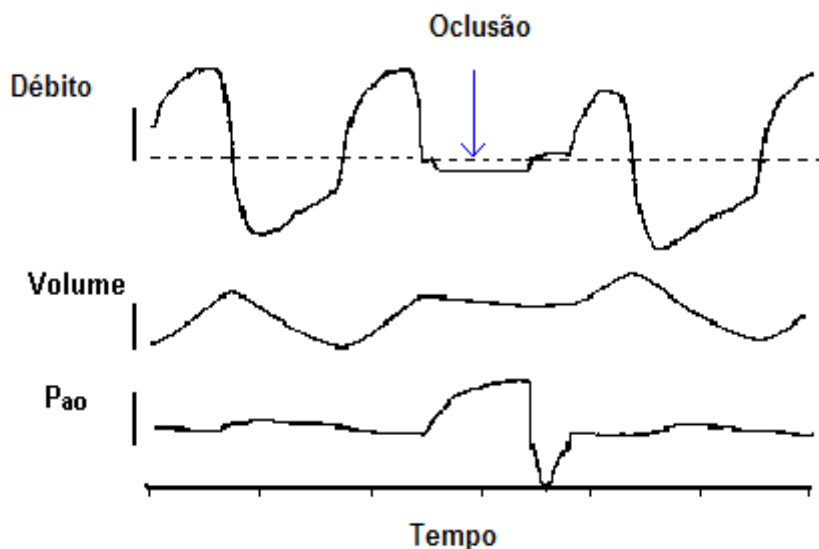


Figura 11 - Efeito de uma fuga no pneumotacógrafo com aplanamento na Pao e alteração do "zero" de sinal.

A colheita de dados de função respiratória foi confinada a períodos de sono profundo traduzidos pela ausência de movimentos oculares, postura relaxada e estável e respiração regular.

2.6.8. Medições em volume corrente

Após verificação da ausência total de fugas no sistema, com a criança em sono profundo apresentando uma estabilidade do padrão respiratório, traduzido pela ausência de modificações da linha de base do EEL, iniciaram-se as medições em volume corrente.

Registaram-se pelo menos vinte e cinco ciclos respiratórios, pretendendo-se que no seu conjunto não ocorresse uma variação superior a 10% entre eles.

Foram registados os seguintes parâmetros: frequência respiratória, volume corrente por quilograma de peso (V_t/kg), tempo da manobra expiratória (t_E), tempo para o *peak expiratory flow* (t_{PEF}) e a razão entre estes últimos (t_E/t_{PEF}).

2.6.9. Medição da Capacidade Residual Funcional (FRC)

O protocolo inicial de estudo de função respiratória incluía a medição da capacidade residual funcional (FRC), tendo sido posteriormente retirado do mesmo, dada a

morosidade da sua realização em conjunto com as técnicas de expiração forçada. Foi demonstrado num estudo piloto que as crianças despertavam durante o exame não se concluindo o objectivo primordial do mesmo que seria a medição dos débitos expiratórios por compressão torácica em volume aumentado.

2.6.10. Manobras expiratórias forçadas

Para realização de manobras expiratórias forçadas em volume corrente foi aplicado um colete à volta do tórax da criança, apertado o suficiente para permitir a entrada de 2 a 3 dedos do operador entre o tórax e o colete.^{515,567}

O objectivo seria permitir que o colete exercesse uma pressão exterior no tórax da criança, comprimindo-o no final da inspiração,^{537,613} de modo a obter-se uma manobra expiratória forçada, reportando-se o parâmetro $V'_{\max\text{FRC}}$ que traduz o débito máximo à capacidade residual funcional.

Dentro deste colete encontrava-se um reservatório extensível de ar, ficando o colete adaptado entre as axilas e a sínfise púbica da criança, envolvendo o tórax e abdómen.

O processo de compressão torácica foi automático, controlado pelo computador. O operador determinou a pressão a aplicar no tórax da criança. Esta pressão foi sempre iniciada com 2-3 kPa, com aumentos progressivos de 1kPa em manobras sucessivas de compressão torácica até um máximo de 10kPa a fim de se atingir uma limitação do débito expiratório visualizável pelo aplanamento da porção expiratória da curva débito-volume, bem como pela ausência de subida dos valores de $V'_{\max\text{FRC}}$.

Critérios de qualidade para $V'_{\max\text{FRC}}$

Na avaliação dos dados obtidos foram considerados os seguintes critérios de aceitabilidade:

1. Estabilidade do EEL previamente à insuflação do colete (Figura 12).
2. Ausência de actividade glótica na visualização das curvas débito-volume.
3. Manobra expiratória contínua até à FRC, sem artefactos.

4. Ausência de fugas na máscara ou pneumotacógrafo.
5. Pressão do colete que atinge aplanamento nos primeiros 100ms após início da insuflação.
6. Atingimento do *peak flow* nos primeiros 30% de volume corrente expirado.

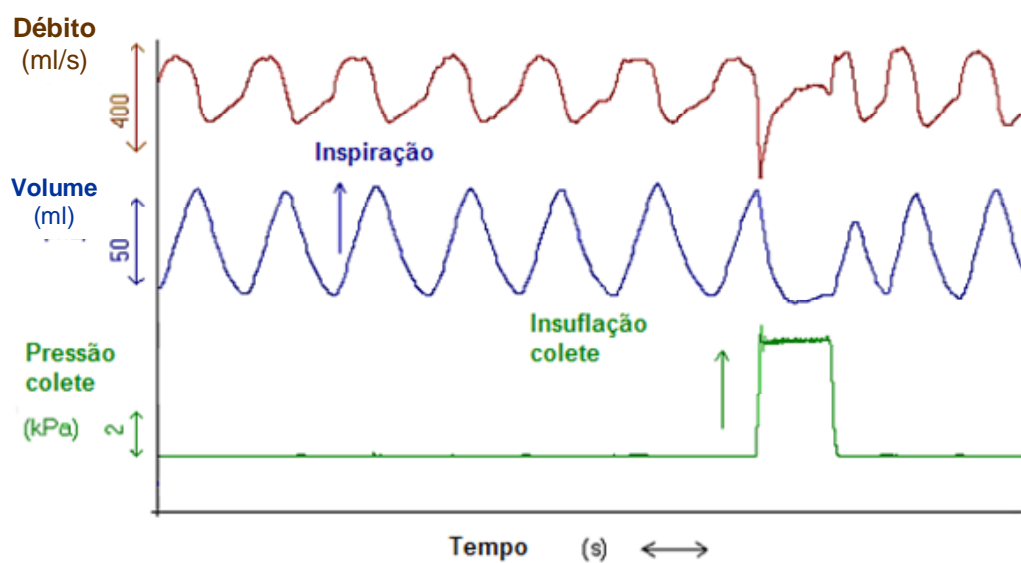


Figura 12 - Traçado em volume corrente com estabilidade do EEL, previamente à insuflação do colete no final da inspiração.

São demonstrados seguidamente exemplos de curvas com (Figura 13) e sem critérios de aceitabilidade (Figuras 14 e 15).

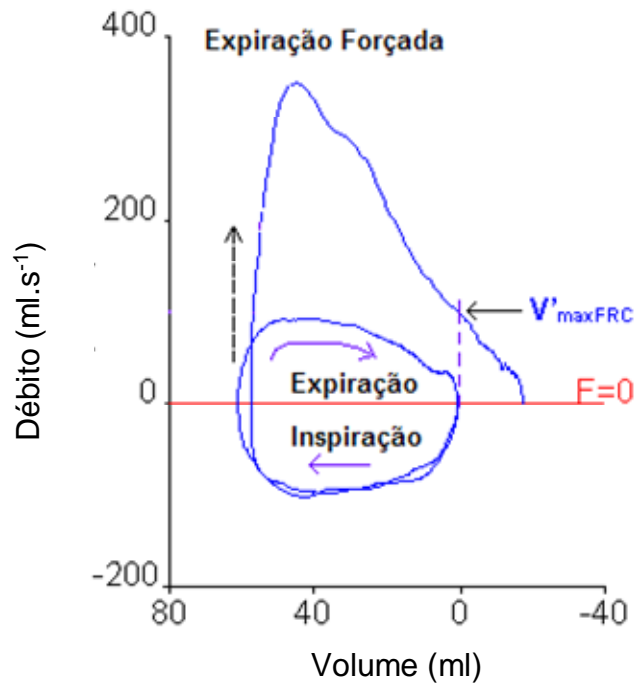


Figura 13 - Curva débito-volume em volume corrente com critérios de aceitabilidade.

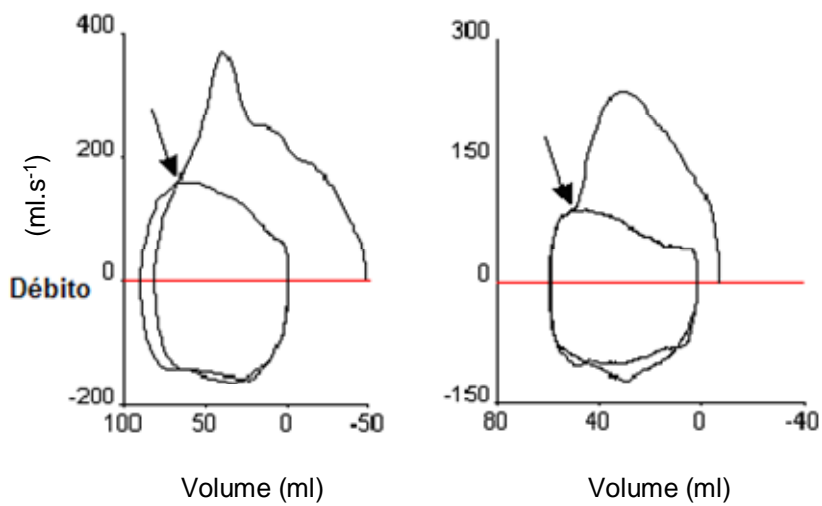


Figura 14 - Curvas débito-volume tecnicamente inaceitáveis - encontra-se sinalizada a insuflação tardia do colete com incapacidade de atingir o *peak flow*, que se alcançou somente a 30% do volume expirado.

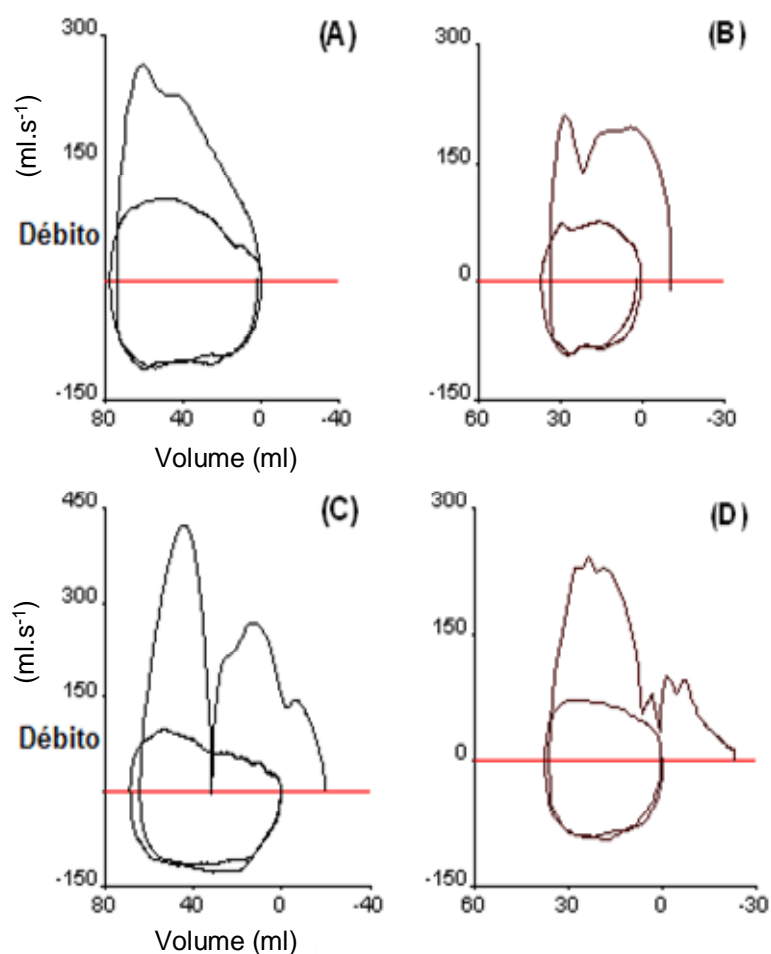


Figura 15 - Curvas débito-volume inaceitáveis por motivos fisiológicos: inspiração precoce (A), actividade glótica no início (B), meio (C) e fim da expiração (D).

Reportar resultados $V'_{\max\text{FRC}}$

Um mínimo de 3 curvas débito-volume tecnicamente aceitáveis e reprodutíveis entre si (variação do valor de $V'_{\max\text{FRC}}$ não superior a 10% ou 10mls⁻¹) foram registadas, reportando-se o valor médio entre estas, o valor máximo e ainda a pressão do colete necessária para obtenção da melhor curva.

Todas as curvas foram sempre analisadas por um investigador independente, do *Hospital for Sick Children* em Londres, que avaliou os critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade.

Os valores obtidos foram reportados em Z-scores utilizando a equação de referência publicada por Hoo e colaboradores, uma das coordenadoras deste projecto, a partir de um estudo multicêntrico internacional.⁶¹⁴

A apresentação de valores em Z-scores pressupõe a distribuição normal de uma população entre o Percentil 3 (correspondendo a Z-score = -1,96) e o Percentil 97 (correspondendo a Z-score = +1,96).

Medição da pressão de transmissão do colete

Durante as manobras expiratórias forçadas foi medida não invasivamente a pressão de transmissão do colete para a parede torácica, devendo esta ser de 2 a 3 kPpa para garantir o atingimento da limitação do débito expiratório e comparação de dados entre centros de investigação distintos.

Manobras de RVRTC

As manobras de compressão torácica em volume aumentado (RVRTC) foram efectuadas imediatamente após a realização das manobras de compressão torácica em volume corrente, utilizando um equipamento adicional descrito anteriormente. A pressão de colete utilizada para as manobras em volume aumentado foi aquela em que se obteve uma limitação do débito expiratório para atingir o débito máximo à FRC, $V'_{\max \text{ FRC}}$.

Para se obterem estas manobras foram efectuadas pelo operador 3 a 4 oclusões das vias aéreas através de um tubo em T ligado ao *Neopuff*, conectado a uma fonte de ar a 12l/min e programado para uma pressão de 30cm H₂O. Após estas insuflações outro operador comandou a compressão torácica com o colete insuflável, utilizando os valores de pressão em que foi atingido o melhor débito máximo em volume corrente.

Com o intuito de auxiliar o relaxamento, as insuflações foram mantidas até se atingir um aplanamento na pressão das vias aéreas, verificando-se uma pausa expiratória após a compressão torácica (Figura 16).

Após cada manobra completa de insuflações-compressão, só se repetiram os procedimentos com a recuperação total do ritmo respiratório após a pausa respiratória.

As compressões torácicas destinadas a forçar a criança a efectuar uma manobra expiratória foram efectuadas no final da inspiração.

A pressão de insuflação utilizada no *Neopuff* registada no computador foi sempre confirmada de modo a se encontrar dentro de 3kPa (entre 2,8 e 3,1kPa), tendo sido demonstrado por outros investigadores como sendo segura e permitindo comparação de resultados inter-centros.⁶¹⁵⁻⁶¹⁷

Todas as curvas obtidas através da utilização de uma pressão muito baixa que não permitisse o aumento do volume até à capacidade pulmonar total, foram rejeitadas. Por outro lado, a utilização de pressões muito elevadas também foi acautelada pela possibilidade de conduzir a fugas, distensão gástrica e encerramento da glote.

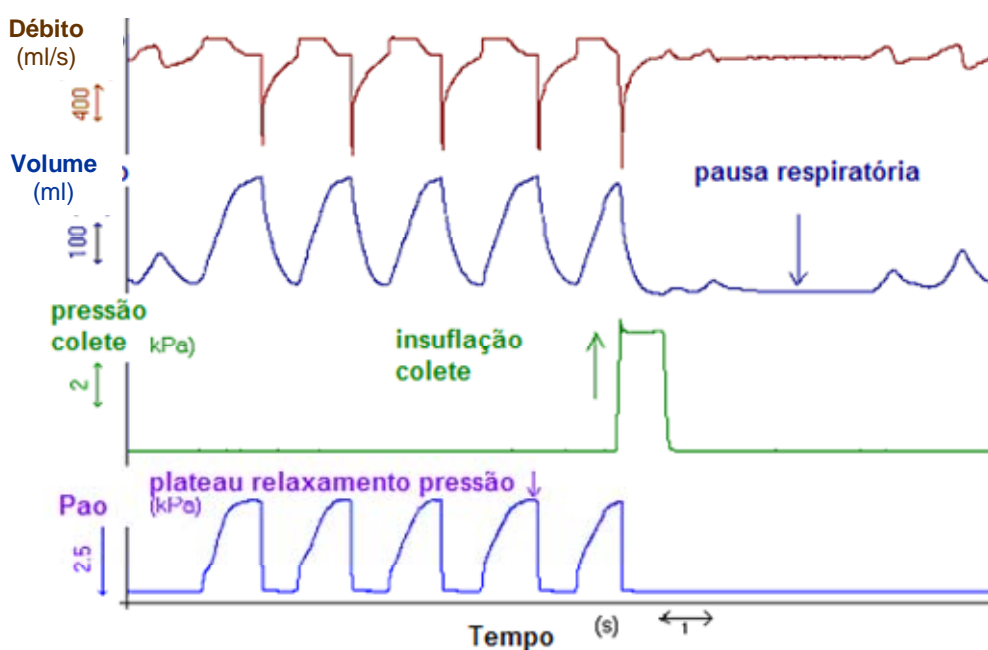


Figura 16 - Traçado com insuflações e compressão torácica em manobra em volume aumentado.

Crítérios de qualidade em volume aumentado

Foram respeitados os mesmos critérios de qualidade referidos para a obtenção do débito máximo à FRC. A todas as curvas foi efectuado o somatório de FVC e FEV_{0,4}, sendo considerada a melhor curva aquela que apresentava o maior valor.

Para se cumprirem critérios de reprodutibilidade este somatório não pôde distar mais de 10% ou 10mls⁻¹ em relação à melhor curva, entre as curvas aceites. Para cada criança foi registada a média e o desvio padrão das curvas aceites (num mínimo de três).

Todas as curvas foram analisadas em computador e impressas em suporte de papel, tendo sido posteriormente confirmadas pelo investigador independente, proveniente do *Hospital for Sick Children* em Londres.

Parâmetros reportados na expiração em volume aumentado

Na curva débito-volume em volume aumentado foram obtidos os parâmetros semelhantes a uma espirometria, registando-se no entanto, volumes expirados em menor tempo de duração (tal como a 0,4seg - FEV_{0,4} e a 0,5seg - FEV_{0,5}). Foram ainda obtidos dados referentes a débitos expiratórios máximos em diferentes pontos da capacidade vital forçada (FEF₂₅, FEF₅₀, FEF₇₅), débitos médios FEF₂₅₋₇₅, capacidade vital forçada e tempo expiratório (t_E).

À semelhança da insuflação em volume corrente foram também registados a pressão de insuflação do colete (P_j), tempo (t_{inf}) e volume de insuflação.

São exemplificadas seguidamente curvas com (Figura 17) e sem critérios de aceitabilidade (Figura 18), documentando-se no primeiro exemplo a diferença explícita entre uma curva em volume corrente e uma curva em volume aumentado.

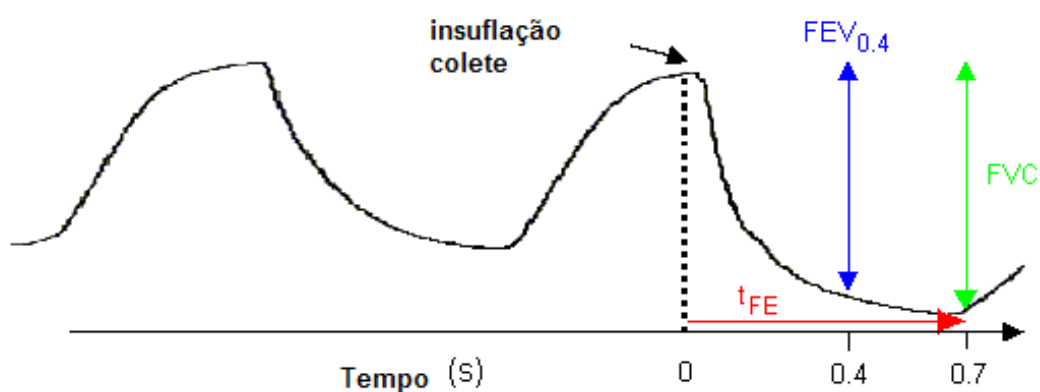


Figura 17 - Curva débito-volume tecnicamente aceitável obtida pela técnica de compressão torácica em volume aumentado.

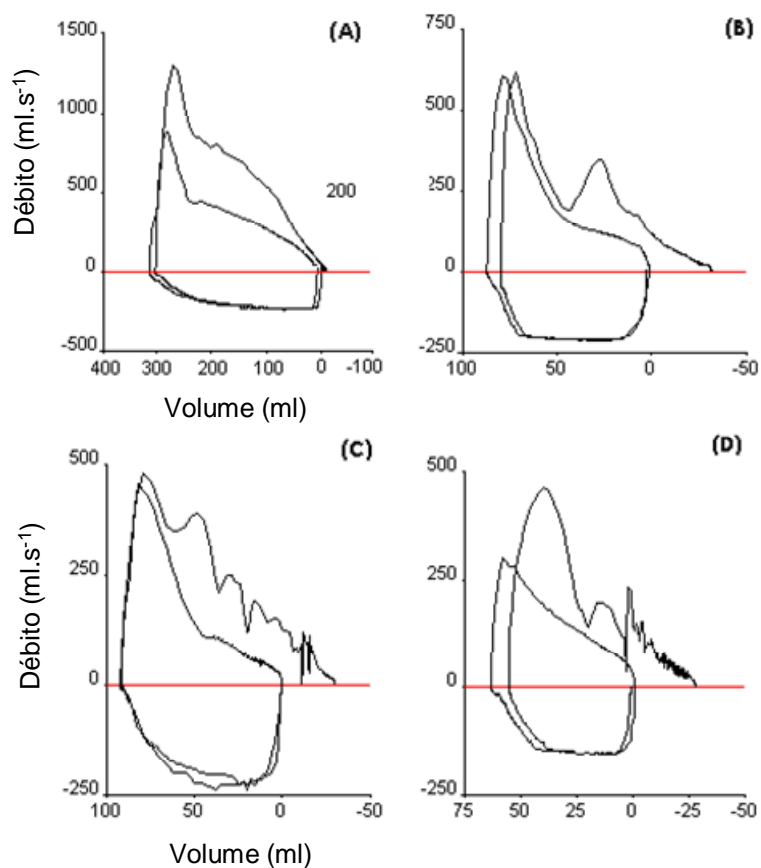


Figura 18 - Exemplos de curvas débito-volume tecnicamente inaceitáveis obtidas pela técnica de compressão torácica em volume aumentado: inspiração precoce (A), compressão torácica tardia (B), actividade glótica precoce (C) e tardia (D).

Os valores obtidos foram reportados em Z-scores utilizando as equações de referência publicadas por Jones e colaboradores, utilizadas como padrão internacional.⁶¹⁶

A apresentação de valores em Z-scores pressupõe a distribuição normal de uma população entre o Percentil 3 (correspondendo a Z-score = -1,96) e o Percentil 97 (correspondendo a Z-score = +1,96).

2.7. Avaliação laboratorial

2.7.1. Colheita de sangue periférico

Foram colhidas amostras de sangue a todas as crianças do grupo de estudo e do grupo controlo, no Hospital de Dona Estefânia.

As amostras de sangue foram recolhidas no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Dona Estefânia, obtendo-se cerca de 7,5 ml de cada criança, por venopunção do sangradouro, sendo o sangue anticoagulado de acordo com o seguinte protocolo: 5ml para um tubo heparinizado e 2,5ml para um tubo com EDTA (*SARSTEDT*, Numbecht, Alemanha). O primeiro foi preparado em condições assépticas e destinava-se a obter as células mononucleadas utilizadas para as culturas celulares. Do segundo, depois de realizado o hemograma e de se retirarem 400 µl para a realização de estudos de citometria de fluxo, separou-se o plasma por centrifugação para os doseamentos de IgE e das células sedimentadas foi extraído o ADN para estudo de polimorfismos. Todas as amostras foram enviadas imediatamente após a colheita para o Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCMUNL).

2.7.2. Avaliação do hemograma

Foi efectuada a avaliação do hemograma num contador hematológico Coulter™, no Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, a partir do qual se obtiveram os valores de eosinófilos e linfócitos.

2.7.3. Doseamento de IgE total e IgE específicas para alergénios alimentares e aeroalergénios

Os doseamentos de IgE total e de IgE específicas para aeroalergénios (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, faneras de cão e gato e pólenes de gramíneas) e alergénios alimentares (ovo total, clara de ovo e gema de ovo) foram efectuados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Dona Estefânia, por método quimioluminiscente enzimático (Immulite 2000®, *Siemens Healthcare Diagnostics*, Estados Unidos da América).

2.7.4. Preparação de amostras para citometria de fluxo

Caracterização e contagem das células T CD4⁺ Reguladoras

As subpopulações T do sangue periférico foram quantificadas e caracterizadas através de análise multiparamétrica por citometria de fluxo (*FACSCalibur™*, *BDBiosciences*, CA, Estados Unidos da América).

Para a caracterização das células T reguladoras foi utilizada uma técnica de imunofluorescência directa, tendo sido utilizados dois protocolos distintos. O primeiro protocolo descreve-se de seguida, e incluía dois tubos: CD3 FITC (10µl) / CD8 PE (10µl) / CD4 PERCPy5.5 (10µl) e CTLA-4 FITC (10µl) / CD25 PE (10µl) / CD4 PERCPy5.5 (10µl) / GITR APC (5µl). Estes tubos foram preparados com os seguintes anticorpos monoclonais de murganho: anti-CD3-FITC (clone SK7, IgG₁, *BD Biosciences*, San Jose, CA, Estados Unidos da América), anti-CD8-PE (clone SK1, IgG₁, *BD Biosciences*, San Jose, CA, Estados Unidos da América), anti-CD4-PERCPy5.5 (clone SK3, IgG₁, *BD Biosciences*, San Jose, CA, Estados Unidos da América), anti-CTLA-4-FITC (clone 48815, IgG_{2b}, *RD*, Minneapolis, Estados Unidos da América), anti-CD25-PE (clone TP1/6, IgG_{2b}, *Immunostep*, Salamanca, Espanha), anti-GITR/TNFRSF18-APC (clone 110416, IgG₁, *RD*, Minneapolis, Estados Unidos da América). Para proceder a este estudo foram adicionados 100µl de sangue periférico anticoagulado com EDTA a cada tubo e 10µl, ou 5µl, de cada anticorpo tal como descrito acima, sendo efectuada homogeneização através de *vortex* e posterior incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.

Para se proceder à lise das hemácias e se fixar a união antigénio-anticorpo foram adicionados 2 ml de *BD FACS Lysing Solution* (*BD Biosciences*, San Jose, CA, Estados Unidos da América), seguindo-se nova incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Os tubos foram depois centrifugados a $275 \times g$ durante 5 minutos decantando-se no final o sobrenadante. Adicionaram-se de seguida 2 ml de *BD FACS Flow* (*BD Biosciences*, San Jose, CA, Estados Unidos da América), a cada tubo, seguindo-se uma centrifugação de 5 minutos a $275 \times g$.

Finalmente adicionaram-se 200 µl de *BD FACS Flow*, com posterior aquisição da amostra no citómetro de fluxo.

A aquisição e análise foram efectuadas utilizando um programa próprio Cell Quest *software* 3.3™ (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos da América). A informação foi recolhida em ficheiros “list mode”, avaliando-se a percentagem de cada população celular em estudo e a intensidade média de fluorescência (escala logarítmica de 0 a 1024 canais de fluorescência).

A definição de janelas para células T auxiliaadoras (CD4 forte/Complexidade celular) e para linfócitos (Tamanho/Complexidade celular), bem como todos os restantes parâmetros foram estabelecidos para cada estudo e mantidos para todos os doentes e controlos saudáveis.

Pelo menos 20000 células T CD4⁺ foram adquiridas utilizando uma janela exclusiva para células T auxiliaadoras, de modo a obter um número suficiente de células que permitisse a avaliação da subpopulação T reguladora.

Foram consideradas células T CD4⁺ positivas para CD25 (Figura 19) todas as células T CD4⁺ localizadas acima da fluorescência inespecífica, previamente definida no tubo FMO (Fluorescence Minus One <http://www.drmm.com/compensation>), onde foram pipetados todos os anticorpos monoclonais à excepção de CD25. As células T CD4⁺ com expressão CD25 forte foram definidas como células T com intensidade média de fluorescência de CD25 superior a 1×10^2 em escala logarítmica, surgindo como um grupo de células localizado acima da população CD4⁺CD25^{fraco} e CD4⁺CD25⁻ de acordo com Baecher-Allan e colaboradores (Figura 19).²³³

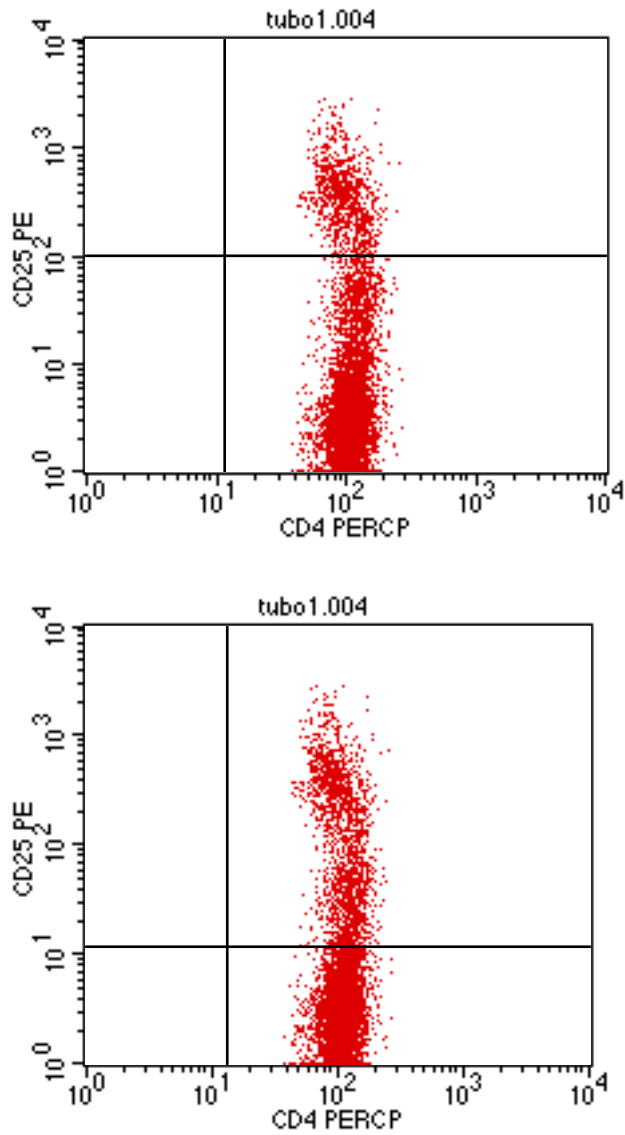


Figura 19 - Avaliação por citometria de fluxo das populações CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{forte}.

Os resultados foram expressos como porcentagem e em valor absoluto de células T CD4⁺. O número total de células foi calculado multiplicando o valor percentual pelo número total de linfócitos obtido a partir do hemograma.

A expressão de CTLA-4 e GITR foi analisada nas células T CD4⁺ CD25⁺ (Figura 20).

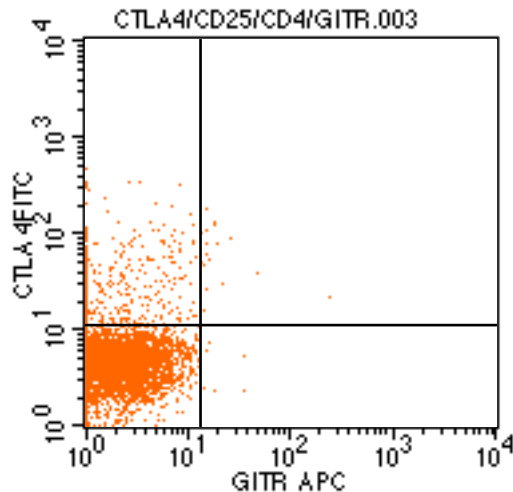


Figura 20 - Avaliação por citometria de fluxo da expressão de CTLA-4 e GITR.

Estudo da expressão de Foxp3 nas células TCD4⁺CD25⁺ por citometria de fluxo

O segundo protocolo incluía a marcação intracelular do factor Foxp3. Neste protocolo foi utilizado o Human Regulatory T cell Staining Kit (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos da América), que incluía os seguintes anticorpos monoclonais de murganho: um *cocktail* de anti-CD4-FITC (clone RPA-T4, IgG₁) e anti-CD25-APC (clone BC96, IgG₁) e anti-Foxp3-PE (clone PCH101, IgG_{2a}). O controlo isotípico do kit era IgG_{2a} PE (*rat*). Foram executados dois tubos: CD4 FITC/ IgG_{2a} PE/ CD25 APC e CD4 FITC/ Foxp3 PE/ CD25 APC, nos quais houve permeabilização das células a marcar.

Para proceder a este estudo foram adicionados 100µl de sangue periférico anticoagulado com EDTA e 10µl do *cocktail* CD4/CD25 a cada tubo, sendo efectuada homogeneização através de *vortex* e posterior incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.

De seguida, procedeu-se à lavagem da suspensão em 1,5ml de *Flow Cytometry Staining Buffer* (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos da América), para remover o excesso de material não conjugado, seguindo-se uma centrifugação de 5 minutos a $275 \times g$, no fim da qual se decantou o sobrenadante.

Para promover a fixação das ligações antigénio-anticorpo e a permeabilização das células (para a penetração do anticorpo monoclonal anti-Foxp3), foi acrescentado a cada tubo 1ml de Fixation/Permeabilization Buffer (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos da América). Procedeu-se a homogeneização através de *vortex*, seguindo-se uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. No final da incubação, seguiu-se uma centrifugação de 5 minutos a $275 \times g$, no fim da qual se decantou o sobrenadante.

Para continuar o processo de permeabilização das células, foi efectuado por duas vezes o seguinte passo: juntou-se a cada tubo 2ml de Permeabilization Buffer (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos da América), seguindo-se uma centrifugação de 5 minutos a $275 \times g$, no fim da qual se decantou o sobrenadante.

De seguida, juntaram-se 10 μ l de anti-Foxp3 a um dos tubos e 10 μ l de controlo isotópico IgG_{2a} ao outro tubo. Após ser efectuada homogeneização através de *vortex*, os tubos foram incubados durante 60 minutos à temperatura ambiente no escuro. Fez-se nova lavagem com 2ml de Permeabilization Buffer, seguindo-se uma centrifugação de 5 minutos a $275 \times g$, no fim da qual se decantou o sobrenadante.

Finalmente adicionaram-se 200 μ l de BD FACS Flow, com posterior aquisição da amostra no citómetro de fluxo.

A análise da expressão de Foxp3 foi determinada na população de células T CD4⁺ e também na população T CD4⁺ com expressão de CD25 (Figura 21).

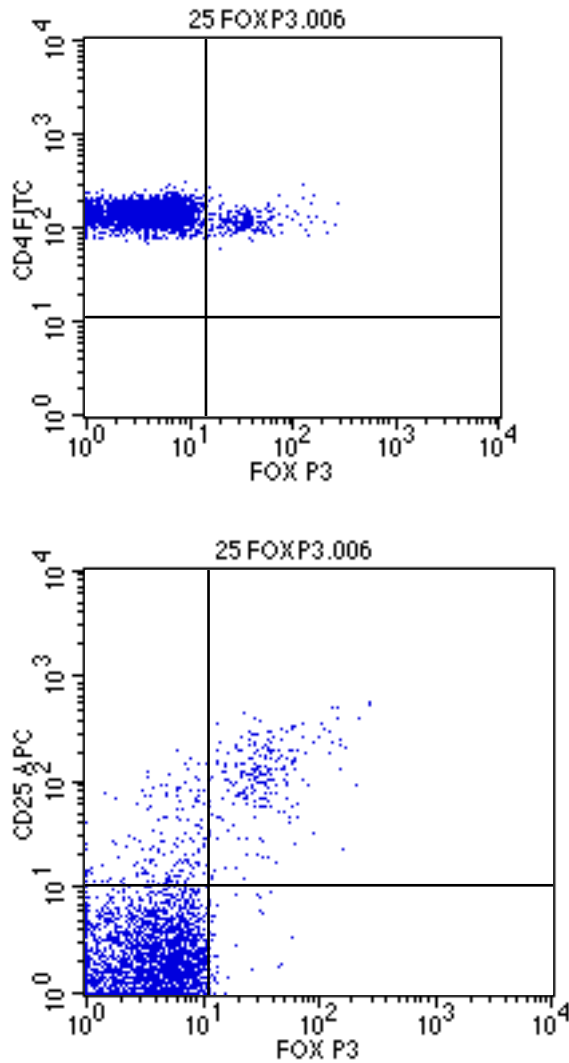


Figura 21- Avaliação por citometria de fluxo da expressão de Foxp3 na população CD4⁺CD25^{forte}.

2.7.5. Culturas celulares com estimulação específica e inespecífica

As culturas celulares para resposta a estímulos mitogénicos e antigénicos foram feitas a partir das amostras colhidas no tubo anticoagulado com heparina e preparado em condições de assepsia, com a finalidade de obterem células para avaliação da expressão génica, tal como se descreve adiante. Os 5 ml de sangue heparinizados foram diluídos com RPMI – SIGMA1640 (*Medium da Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos da América*) até perfazer um volume de 10 ml.

As células mononucleares foram obtidas por centrifugação do sangue total em gradiente de densidade Ficoll d=1077 g/l (Lymphoprep[®], *AXIS-SHIELD, POC, AS*, Oslo, Noruega) $1200 \times g$ durante 20 minutos, à temperatura ambiente, numa proporção de 5 ml de sangue para 3 ml de gradiente de densidade.

O anel linfocitário formado após centrifugação foi recolhido e as células ressuspendidas em 10 ml de meio de cultura RPMI – SIGMA1640 (Medium da Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos da América), com solução tampão HEPES. Seguiu-se uma primeira lavagem, centrifugando-se as células a $1000 \times g$ durante 10 minutos, a 4° C, rejeitando-se no final o sobrenadante e ressuspendendo-se as células em igual quantidade de meio.

No final, as células foram ressuspendidas em 1 ml de meio de cultura completo RPMI enriquecido com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 2mM de L-glutamina, 1mM piruvato de sódio, 0,5 μ M de 2-mercaptoetanol, antibióticos (0,1mg/ml de estreptomicina; 100U/ml de penicilina) e 10% v/v de soro de vitela fetal (SVF) (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos da América) tendo-se procedido à contagem em câmara de *Neubauer*, ajustando-se a concentração final a 1×10^6 de células por ml utilizando para o efeito meio completo.

As culturas decorreram em microplacas (*Greiner Bio One*, Frickenhansen, Alemanha) de 48 poços, sendo dispensados 400 μ l da suspensão final de células por poço (4×10^5 células) incubadas em estufa (*Heraeus HERAcell[®] CO2 Incubator*, MA, Estados Unidos da América) a 37° C, 5% de CO2 e saturação de humidade.

A estimulação foi feita com:

1 - 1 μ g/ml de acetato de forbolmiristato (PMA), (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos da América) e 2,5 μ g/ml de ionomicina, (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos da América).

2- Extracto de ácaros (CAST allergen *D. pteronyssinus* e CAST allergen *D. farinae* – *Bühlmann Laboratories*, Basel, Suíça) - 80 μ l (40 μ l *D. pteronyssinus* e 40 μ l *D. farinae*, a uma concentração de 100ng/ml, após diluição com RPMI).

Para cada um dos estímulos foram utilizados diferentes tempos, assim:

- a) As células estimuladas com PMA foram incubadas durante 24 horas.
- b) As células incubadas com extractos de ácaros foram mantidas em cultura durante 7 dias.

Foram efectuados controlos (células sem estímulo) tanto para as 24 horas como para o 7º dia.

Após as incubações nos períodos de tempo adequados, as células de cada poço foram ressuspensas no meio de cultura com auxílio de uma micropipeta e dispensadas em microtubos, tendo sido identificadas cada uma das amostras. Estes foram seguidamente centrifugados em microcentrífuga 5 minutos a $1000 \times g$ a 4°C .

O sobrenadante resultante foi removido e o *pellet* de células foi ressuspenso em $400 \mu\text{l}$ da solução estabilizadora do ARN celular, RNAlater[®] (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos América) e guardadas a -20°C .

2.7.6. Extracção ARN de células mononucleares

As amostras anteriormente conservadas em RNAlater[®] foram depois centrifugadas a $10.000 \times g$, 5 minutos, a 4°C , tendo sido no final removido o sobrenadante sem perturbar o *pellet*. A extracção de ARN total foi feita, com o sistema comercial GenElute[®] Mammalian Total RNA (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos América) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente o procedimento foi o seguinte:

As células foram lisadas e homogeneizadas em $250 \mu\text{l}$ de mistura de solução de lise contendo tiocianato de guanidina e 2-mercaptoetanol (2-ME) adicionado a 1% v/v como agente inactivador de nucleases.

De seguida o crude de células lisadas foi transferido para uma coluna de filtração e centrifugado a $10.000 \times g$, 2 minutos a 4°C . Ao filtrado colhido no tubo de colecta foram adicionados $250 \mu\text{l}$ de solução de etanol a 70% e homogeneizada a solução em *vortex*. Pipetou-se esta solução para a coluna de ligação e centrifugou-se a $10.000 \times g$,

2 minutos a 4° C. Com esta operação o ARN ficou retido na membrana da coluna, que foi transferida para um novo microtubo para a lavagem com 500 µl de tampão de lavagem I. Após esta primeira lavagem foram eliminados eventuais traços de ADN genómico retido na coluna por digestão com DNase com recurso ao *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, Alemanha) utilizando-se uma solução com 10 µl de DNAase e 70 µl tampão RDD por cada amostra, com posterior incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Seguiram-se 2 lavagens com 500 µl tampão de lavagem II e a eluição do ARN da coluna de ligação usando como eluente H₂O sem nucleases, obtendo-se uma solução de ARN total para a transcrição reversa. Em média foram isolados cerca de 1µg de ARN de cada amostra. A quantificação da quantidade de ARN foi efectuada por medição de absorvância a 260 nm e a pureza da solução avaliada pela razão da absorvância 260/280 nm usando uma cuvete de quartzo, num espectrofotómetro UV1101 – Biotech Photometer (WPA, Cambridge, Reino Unido). Foram apenas processadas as amostras com esta razão entre 1,9 e 2,1.

Transcrição reversa

A reacção de PCR é realizada por uma ADN polimerase que reconhece como modelo a copiar a molécula de ADN. Assim, torna-se necessário transcrever o ARN isolado em ADN complementar (cADN) de uma forma proporcional à quantidade de cada espécie de ARN que existe na solução. Este procedimento designa-se por transcrição reversa e consiste numa reacção *in vitro* que submete o ARN isolado à actividade de uma transcriptase reversa na presença dos quatros desoxirribonucleótidos dATP, dTTP, dCTP e dGTP (dNTP's) e iniciadores hexanucleótidos com sequência aleatória. Para esta reacção utilizaram-se os reagentes do sistema comercial "*High Capacity cDNA Archive Kit*" (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, Estados Unidos América) de acordo com as indicações propostas pelo fabricante.

Foi então preparada uma mistura mãe contendo por reacção 10 µl de tampão RT, 10 µl de iniciadores, 5 µl de dNTP's e 5 µl de Transcriptase reversa *Multiscribe*.

A esta mistura foi adicionado 1 µg de ARN total purificado, obtido na fase anterior e H₂O *nuclease free* para um volume reaccional final de 100 µl.

Submeteu-se de seguida a mistura reaccional ao seguinte perfil térmico num termociclador *MJ Research PTC100* (GMI, Ramsey, Minnesota, Estados Unidos da América): 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos e 4°C até ser retirada.

2.7.7. Análise da expressão de genes imunoreguladores por PCR quantitativo (RT Real Time PCR)

O PCR em Tempo Real é uma técnica que durante a reacção de PCR permite monitorizar, em tempo real, a formação de produto amplificado. Esta monitorização é possível através da introdução de uma fonte de fluorescência que quantificada ciclo a ciclo é proporcional ao produto de PCR formado. Neste caso recorreu-se à metodologia das sondas TaqMan® que consistem em oligonucleótidos complementares a uma região interna do produto de PCR (entre os dois iniciadores) e que possuem numa das extremidades uma fluorescência e numa outra um composto absorvente da fluorescência, um *quencher*. A sonda oligonucleotídica enquanto intacta não emite fluorescência. No entanto, durante a reacção de PCR e devido, à actividade de 5'-3' exonuclease da DNA polimerase, a sonda Taqman® é degradada, passando a emitir fluorescência. Este aumento da fluorescência é proporcional ao produto de PCR acumulado.

Desta forma é possível seguir a acumulação de produtos de reacção e analisar a cinética da reacção sobre a forma de um gráfico do sinal de fluorescência (R_n) vs número de ciclos que mostra uma curva de amplificação, ou seja, uma indicação da quantidade do produto gerado durante cada ciclo. Nos ciclos iniciais a variação da fluorescência ΔR_n é mínima e define a linha base ou *baseline* onde a acumulação de produto amplificado está abaixo do limite de detecção do aparelho. Quando o ΔR_n ultrapassa esta linha, o produto amplificado é detectado, o que permite definir o ciclo '*threshold*' (C_T) que corresponde ao número do ciclo onde a fluorescência ultrapassa a linha de *threshold*, calculada como sendo 10 vezes o desvio padrão da média do sinal de fluorescência da linha de *baseline*. Uma amostra que contenha um maior número de cópias de cADN para o gene em estudo, amplifica primeiro e portanto o sinal de fluorescência cruza mais cedo a linha de *threshold*, ou seja tem um C_T mais baixo que uma amostra com um número cópias inferior. O C_T é usado para os cálculos de quantificação da amostra.

Os resultados de quantificação da expressão de um determinado gene são expressos como valores normalizados em relação à expressão de um controlo endógeno, tendo sido usado para o efeito o gene da β -actina, e calculados através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de acordo com o método descrito por Livak e Schmittgen,⁶¹⁸ que define o valor de expressão normalizada de um determinado gene numa determinada amostra, comparativamente à expressão desse mesmo numa outra amostra e em que ΔC_T se define como a diferença entre do $C_{T\text{gene}}$ com $C_{T\beta\text{-actina}}$.

A expressão de cada uma das moléculas seleccionadas (CTLA-4, Foxp3, IFN γ , TGF- β e IL-10), foi avaliada de forma semi-quantitativa através de comparação com a expressão do gene β -actina. Para estas determinações foram usadas soluções de iniciadores e sondas Taqman® fornecidos pela *Applied Biosystems* com concentrações e eficiência pré-otimizadas pelo fornecedor (<https://www2.appliedbiosystems.com/>).

Na tabela V são apresentadas as referências comerciais da *Applied Biosystems* dos ensaios utilizados neste trabalho.

Tabela V- Referências da *Applied Biosystems* para os ensaios de expressão de mRNA utilizados.

CTLA-4 → Hs00175480_m1
Foxp3 → Hs00203958_m1
IFN γ → Hs00174143_m1
TGF- β → Hs00171257_m1
IL-10 → Hs00174086_m1

Os ensaios de PCR em Tempo Real foram realizados num sistema ABI SDS 7500 *Fast Real-Time PCR* (*Applied Biosystems*, Foster City CA, Estados Unidos América), em duplicado para cada gene alvo e *housekeeping* 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 10 μ l: 5 μ l de Taqman PCR Universal Master Mix®, No Amperase® UNG (*Applied Biosystems*, Foster City CA, Estados Unidos América), 2 μ l

de solução de iniciadores com sonda Taqman® (*Applied Biosystems*, Foster City CA, Estados Unidos América) e água MilliQ (qb para 10 µl).

A esta solução foi adicionado o volume correspondente a 20 ng de cADN de cada amostra.

Foi também preparada uma reacção controlo negativo com cada um dos *primers* e uma sonda, à qual não foi adicionado o cADN, 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 com as seguintes condições: 95°C durante 20 segundos, 95°C durante 3 segundos, 60°C durante 30 segundos.

A detecção e normalização da formação de fluorescência durante a reacção de PCR foram realizadas pelo sistema ABI de detecção sob controlo do *software* ABI SDS v2.3 (*Applied Biosystems* Foster City CA, Estados Unidos América), tendo-se determinado o C_T para cada gene em estudo.

Os resultados apresentados foram expressos com transformação em \log_2 da razão entre a expressão obtida em cultura com estímulo e a expressão obtida em cultura sem estímulo (controlo), para as 24 horas (com utilização de estímulo inespecífico) e para o 7º dia (com utilização de estímulo específico).

2.7.8. Extracção ADN de sangue periférico

No isolamento e purificação de ADN genómico a partir das amostras de sangue periférico foi utilizado o sistema comercial, *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Procedeu-se à mistura e homogeneização, num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml de volume, de 200 µl de amostra de sangue total, 20 µl de proteinase K e 200 µl de tampão de lise AL.

Seguiu-se uma incubação a 58 °C durante 10 minutos, no final da qual foi adicionado 200 µl de etanol absoluto, que se misturou em *vortex* durante 15 segundos.

No final da homogeneização a mistura foi colocada numa coluna *QIAamp mini spin* e centrifugada a $10.000 \times g$, 1 minuto à temperatura ambiente.

A coluna que reteve o ADN foi colocada num tubo de 2 ml, descartando-se o tubo que continha o filtrado. Procedeu-se à lavagem do filtro da coluna com a adição de 500 μL de tampão AW1, e nova centrifugação a $10.000 \times g$ durante 1 minuto.

A coluna foi colocada num novo tubo de 2 ml descartando o tubo com o filtrado, adicionou-se 500 μl de tampão AW2 e centrifugou-se a $14.000 \times g$ por 3 minutos. De forma a retirar um possível excesso de AW2 da coluna repetiu-se a centrifugação em novo tubo de colecta vazio.

A eluição foi feita com 200 μl de tampão AE, incubado na coluna à temperatura ambiente durante 1 minuto, seguindo-se uma centrifugação a $10.000 \times g$ por 1 minuto.

A concentração de ADN foi determinada através dos valores de absorvância a 260 nm num espectrofotómetro, tendo em conta que uma solução de ADN, de concentração igual a 50 $\mu\text{g/ml}$, apresenta uma $A_{260\text{nm}}$ igual a 1. Deste modo, foi possível calcular a concentração final de ADN com a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de ADN } (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times \text{factor de diluição} \times 50$$

A pureza do ADN foi determinada pela razão A_{260}/A_{280} , cujos valores no intervalo 1,7-1,9, indicam soluções de ADN puras.

2.7.9. Análise de Polimorfismos de Nucleótidos Singulares (SNPs) genómicos por química Taqman

Os Polimorfismos de Nucleótidos Singulares (SNPs) foram determinados por amplificação das sequências de ADN (a partir de 10 ng de ADN para cada ensaio) utilizando sondas TaqMan®, PCR Universal Master Mix (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, Estados Unidos América), específicas para cada SNP. Esta metodologia permite identificar e classificar SNPs bialélicos, uma vez que em cada ensaio são incluídas duas sondas oligonucleotídicas que diferem apenas num único nucleótido e no tipo de fluorescência (um oligonucleotido complementar a um alelo é marcado com VIC enquanto o outro é marcado com FAM).

Gene	Referência NCBI*	Referência do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos América)	Sequência das sondas	Função*
ADAM 33 [1]	<u>rs528557</u>	C___601719_20	[C/G]CCTGGGAGCAGAGGCAGCAGGACGC	Sinónimo
	<u>rs2280091</u>	C__15969370_10	[A/G]TGGGGTGAACGCCGCCAGGGGGTG	Missense (Thr/ Met)
	<u>rs3918392</u>	C__25997586_10	[C/T]TCCTTTCCAGGTGAGCAGCTGCTCC	Missense (Ala/ Thr)
	<u>rs3918395</u>	C__11201375_10	[A/C]CGAAACCCTCACCTGAACCTTCCA	Intrão
	<u>rs3918396</u>	C__1276547_20	[C/T]GCTGAGGAGCATGGCCAGCAGGAAG	Missense (Ile/Val)
	<u>rs2787094</u>	C__11201381_1_	[C/G]CAGGGGAGTGTGGACTCAGTCGAAC	3'UTR
	<u>rs597980</u>	C__1276549_10	[A/G]CAGCTGACCAGTGGTATGGAGTGAA	Intrão
GPRA [2]	<u>rs740347</u>	C___540102_10	[C/G]AGCATAAATAATCTGAACAACCCTG	Intrão
[3]	<u>rs324377</u>	C__2594474_10	[A/C]AATCACTGCCTTCTGACTTCAACTT	Intrão
[3]	<u>rs323922</u>	C__2959829_10	[C/G]TTTCTCAGGAGTCCCTGGGGGAGGT	Missense (Val/Ile)
DPP 10 [4]	<u>rs2053724</u>	C__2147046_10	[C/G]CTCAGAACATCTCCATCCTCACAGT	Missense (Ala/Pro)
	<u>rs35766316</u>	C__25633913_10	[A/G]TATACTGCTTCATATGTGATTTACA	Sinónimo
	<u>rs36044503</u>	C__25633886_20	[A/G]TGAACCCAACAATAAAATTATATGT	Missense (Met/ Val)

* número de acesso à base de dados de polimorfismos “*dbSNP of National Center for Biotechnology Information-NCBI*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).[1] Van Eerdewegh e colaboradores³³⁹; [2] Kormann e colaboradores³⁶⁰; [3] Mellen e colaboradores³⁶¹
[4] Allen e colaboradores³⁵⁴

A selecção das sondas foi feita segundo a existência fundamentada na literatura de forte associação à asma e possibilidade de ensaio disponível no construtor de reagentes.

As reacções real-time PCR foram monitorizadas no ABI SDS 7500 Fast Real-Time PCR System, (*Applied Biosystems* Foster City, CA, Estados Unidos América). Todas as reacções foram executadas em duplicado com os parâmetros de ciclo térmico indicado pelo fabricante. O primeiro ciclo ocorreu a 50°C durante 2 minutos seguido de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, e 40 ciclos 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Para cada polimorfismo, verificou-se a fluorescência final. Foram agrupadas as amostras que originaram fluorescência FAM, VIC ou simultaneamente FAM e VIC.

2.7.10. Medição de cotinina urinária

Foi efectuada colheita de urina através da colocação de algodão seco na fralda dos lactentes que seria recolhido algumas horas mais tarde, conquanto não ocorresse contaminação por fezes, sendo posteriormente colocado o algodão numa seringa que se espremia para um tubo seco. O volume mínimo de amostra foi de 20 µl. A urina recolhida foi congelada e armazenada a -20°C no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Dona Estefânia. Procedeu-se à quantificação da cotinina urinária (metabolito da nicotina) pelo método quimioluminiscente enzimático competitivo (Immulite 2000®, *Siemens Healthcare Diagnostics*, Estados Unidos da América).

Considerou-se comprovada a existência de exposição passiva ao fumo de tabaco se o doseamento da cotinina urinária fosse superior a 15µmol/ml. Foi utilizado o índice preditivo de exposição tabágica, definido como positivo no caso de mãe fumadora (na gravidez e/ou pós-natal) ou doseamento de cotinina urinária positivo.⁶⁰³

2.7.11. Análise estatística

a) Para o estudo funcional respiratório

O cálculo da potência foi efectuado aquando do estudo que permitiu identificar diferenças entre as crianças sibilantes e controlos saudáveis, ajustando pelas variáveis sexo, idade e características antropométricas. Com 35 crianças em cada grupo foi encontrada uma potência de 80% para detectar uma diferença de 0.67 Z-score. As avaliações nos subgrupos de crianças com sibilância recorrente, 20 crianças no grupo de alto risco e 20 crianças no grupo de baixo risco, proporcionaram uma potência de 80% para detectar uma diferença de 0.9 Z-score.

As comparações entre as características e parâmetros de avaliação funcional respiratória de cada grupo, foram efectuadas por intermédio do teste t de Student, com intervalo de 95% de confiança (IC95%), após verificadas as condições de aplicabilidade deste teste paramétrico (distribuições Gaussianas e igualdade de variabilidades). Para a análise de variáveis de categoria foi efectuado o teste de qui-quadrado.

A avaliação da associação entre sibilância recorrente e parâmetros de função respiratória foram examinados através da regressão linear múltipla após o ajustamento para o sexo, características antropométricas e factores de confundimento tais como o tabagismo materno na gravidez e os factores de risco para asma.

b) Para o estudo laboratorial

As comparações entre as características e parâmetros de citometria de fluxo bem como de expressão de citocinas das crianças saudáveis e sibilantes foram efectuadas através do teste t de Student ou do teste de Mann-Whitney, de forma a detectar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Este último teste estatístico foi aplicado sempre que não se verificaram as condições de aplicabilidade do primeiro (distribuições Gaussianas e igualdade de variabilidades).

Para comparar os subgrupos de crianças sibilantes de alto e baixo risco para asma e o grupo de crianças saudáveis foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA I) ou o teste de Kruskal-Wallis sempre que alguma das condições de aplicabilidade da ANOVA não foi cumprida (distribuições Gaussianas e igualdade de variabilidades). Se foram

detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, houve necessidade de utilizar um teste de comparações múltiplas (Least Significant Difference – LSD) para detectar quais os grupos que diferiam entre si. No caso do teste de Kruskal-Wallis, os valores de p foram obtidos após aplicar uma ANOVA às ordens.

A avaliação da associação entre sibilância recorrente e parâmetros laboratoriais foi efectuada através de uma regressão linear múltipla após ajustamento para o sexo, características antropométricas e factores de confundimento tais como o tabagismo materno na gravidez.

Para a análise dos polimorfismos foi efectuado o teste de qui-quadrado ou o teste exacto de Fisher sempre que não se verificaram os critérios de Cochran (pelo menos 80% das frequências esperadas superiores a 5 e todas superiores a 1). Estes testes foram efectuados após a construção de tabelas de contingência que permitiram relacionar as variáveis em estudo.

Foi utilizada a média aritmética como medida de localização e o desvio padrão como medida de dispersão, sempre que a variabilidade era aceitável (coeficiente de variação <50%), não existissem observações aberrantes (*outliers*) e a distribuição fosse aproximadamente simétrica. Caso contrário, a mediana foi a medida de localização eleita e como medida de dispersão, utilizou-se a amplitude inter-quartil.

Sempre que o teste t de Student foi aplicado, apresentaram-se os respectivos intervalos de confiança para a diferença dos valores médios.

O nível de significância utilizado foi $\alpha=0,05$.

O tratamento estatístico dos dados foi efectuado com o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 15.0 para Windows.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da amostra em estudo

Durante os 2 anos de recrutamento de crianças para o estudo, 94 lactentes com sibilância recorrente apresentaram critérios de elegibilidade para o estudo. Refira-se que foram referenciadas um total de 135 crianças com sibilância recorrente para participação neste projecto de investigação, mas na primeira consulta efectuada pelos investigadores 41 crianças apresentavam critérios de exclusão. Os pais de 82 (87%) das 94 crianças elegíveis, consentiram a participação no estudo. No entanto apenas em 55 (67%) foi possível efectuar as provas de função respiratória, uma vez que 27 desistiram da sua participação durante o estudo, 23 dos quais pela necessidade de sucessivas marcações do exame por intercorrência respiratória, internamento ou início de terapêutica com corticóide inalado ou antagonista dos receptores dos leucotrienos (algumas crianças recorreram ao serviço com cancelamento e posterior marcação cinco vezes, com média de cancelamento de duas vezes). Registou-se que 4 crianças faltaram no dia dos exames apesar de confirmação prévia.

Deve salientar-se que foi estipulada a realização das provas em período assintomático, três semanas após a última intercorrência respiratória. Mesmo nas crianças cujos pais consentiram a sua participação muitas delas tiveram de ser remarcadas, tendo uma criança efectuado a sua prova cerca de cinco meses após a marcação inicial.

Das crianças com sibilância recorrente que efectuaram provas de função respiratória, 50 tinham medições em volume corrente e curvas de manobras expiratórias forçadas parciais com critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade enquanto que apenas 44 tinham curvas com critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade em volume aumentado (Figura 22).

Para o estudo laboratorial, a todas as crianças que completaram os exames de função respiratória foi efectuada colheita de sangue e de urina.

O grupo de crianças sibilantes tinha uma média etária (na data de realização das provas funcionais respiratórias e estudo laboratorial) de 63,2 semanas, com 32 (64%) crianças do sexo masculino.

As crianças sibilantes foram classificadas em dois subgrupos distintos: alto risco e baixo risco de asma a partir da aplicação do índice preditivo de asma de Castro Rodriguez e colaboradores.⁴⁴

No grupo de crianças sibilantes, 13 (26%) tinham história parental de asma (10 com história materna e 3 com história paterna), 3 (6%) história pessoal de eczema, 7 (14%) história pessoal de rinite, 21 (42%) sibilância fora do contexto infeccioso e 14 (28%) contagem de eosinófilos no sangue periférico superior a 4%.

Na avaliação dos subgrupos de crianças sibilantes verificou-se que no subgrupo de crianças de alto risco para asma, 13 (76%) tinham história parental de asma, 3 (18%) história pessoal de eczema, 5 (29%) história pessoal de rinite, 12 (71%) sibilância fora do contexto infeccioso e 9 (53%) contagem de eosinófilos no sangue periférico superior a 4%. No subgrupo de crianças de baixo risco para asma, 2 (6%) tinham história pessoal de rinite, 9 (27%) sibilância fora do contexto infeccioso e 5 (15%) contagem de eosinófilos no sangue periférico superior a 4%.

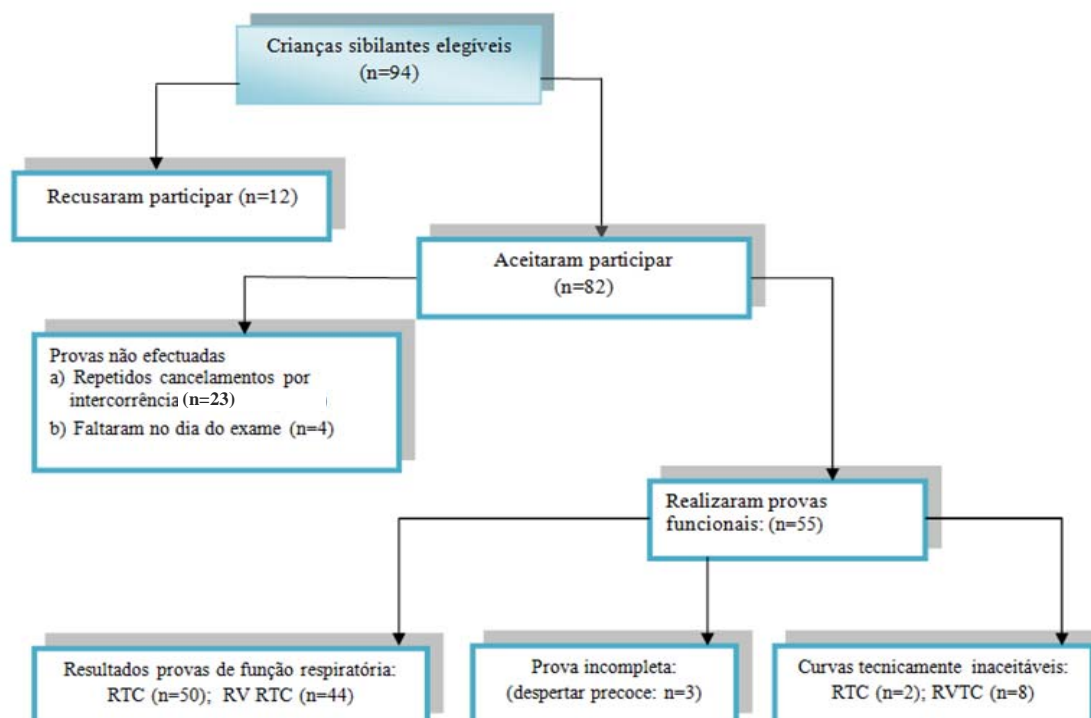


Figura 22 – Diagrama de participação das crianças sibilantes com respectiva distribuição consoante o exame funcional respiratório efectuado.

Das crianças pertencentes ao grupo controlo, constituído por crianças saudáveis, sem quaisquer patologias e sem antecedentes de doença do foro respiratório, tinham critérios de elegibilidade para participar no estudo com realização de provas funcionais respiratórias 59, mas apenas 21 (36%) aceitaram participar no estudo com realização de provas funcionais respiratórias. De entre estas, 14 (24%) efectuaram provas de função respiratória e as restantes não compareceram no dia da marcação (Figura 23). Das crianças que efectuaram as provas de função respiratória, 12 tinham medições em volume corrente e curvas de manobras expiratórias forçadas parciais com critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade e 11 tinham curvas com critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade em volume aumentado (Figura 23).

Os pais de 16 (27%) crianças apenas consentiram na realização do estudo laboratorial, tendo recusado a realização das provas funcionais respiratórias. A todas as crianças que completaram os exames de função respiratória foi possível colheita de sangue e de urina.

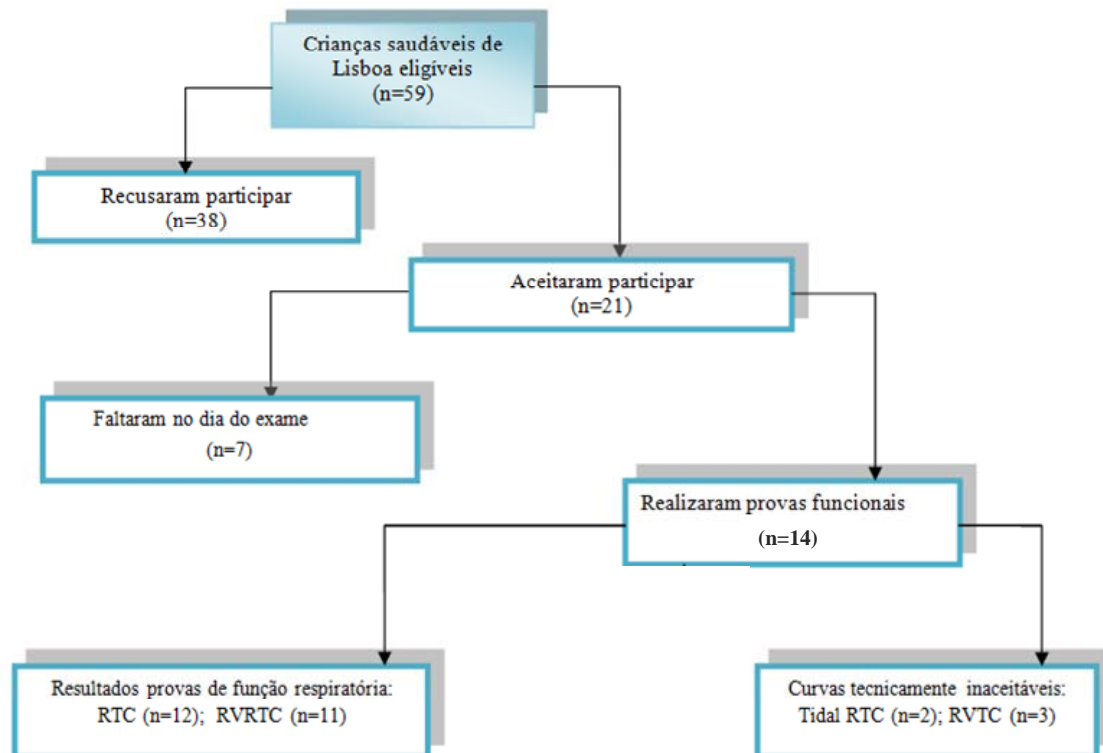


Figura 23 – Diagrama de participação das crianças saudáveis com respectiva distribuição consoante o exame funcional respiratório efectuado.

Pela necessidade de obter uma amostra de maior dimensão de controlos saudáveis na avaliação funcional respiratória, foram incluídas 18 crianças saudáveis do Laboratório de Função Respiratória do *Institute of Child Health - Great Ormond Street Hospital for Sick Children*, da Universidade de Londres, que cumpriam os critérios do estudo e tinham curvas com critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade em volume corrente, bem como nas manobras expiratórias forçadas parciais e em volume aumentado. Todas as crianças do grupo estudo bem como do grupo controlo (provenientes de Lisboa ou de Londres) eram caucasianas.

Uma vez que se pretendia utilizar todos os controlos saudáveis (centro português e centro britânico) como uma população única, tornou-se imperioso a comparação das características de ambas as subpopulações a fim de averiguar da similaridade entre estas para a sua aglutinação.

A distribuição por sexo, idade gestacional, características antropométricas ao nascer e exposição ambiental ao fumo do tabaco *in utero*, traduzida pelos hábitos tabágicos maternos, encontram-se na tabela VII.

Tabela VII. Comparação entre os subgrupos de crianças saudáveis: Lisboa vs. Londres

Crianças Saudáveis				
	Lisboa (n=12)	Londres (n=18)	Diferença Média (95% IC) Lisboa-Londres	Valor p
n (% sexo masculino)	10 (83%)	8 (44%)		0,01*
Idade gestacional, semanas	39,3 (1,1)	39,8 (1,0)	-0,5 (-1,2; 0,3)	0,2
Peso ao nascer, kg	3,2 (0,3)	3,4 (0,5)	-0,2 (-0,5; 0,2)	0,3
Peso nascer em Z- score	-0,4 (0,7)	-0,1 (0,9)	-0,3 (-0,9; 0,4)	0,4
Tabagismo materno na gravidez, n (%)	2 (17%)	3 (17%)		1,0

*estatisticamente significativo, $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média (desvio padrão) para variáveis contínuas (teste *t Student*) e n (%) para variáveis de categoria (teste χ^2).

Pela análise dos dados expostos se infere que havia uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$) no número de crianças do sexo masculino no grupo de crianças do centro de Lisboa em comparação com as provenientes do centro de Londres, sendo superior nas crianças provenientes do primeiro centro. A idade gestacional ao nascer, peso ao nascer, peso ao nascer ajustado para a idade e sexo, em Z-scores, e percentagem de mães fumadoras durante a gravidez eram semelhantes entre os 2 grupos (Tabela VII).

3.2. Provas Funcionais Respiratórias

3.2.1. Comparação entre os grupos de crianças saudáveis

Tal como referido anteriormente, o grupo de crianças saudáveis que realizou provas de função respiratória, incluiu crianças de dois centros distintos: Lisboa (Hospital de Dona Estefânia) e Londres (*Great Ormond Street Hospital for Sick Children*).

Pela análise da distribuição das crianças saudáveis quanto à idade, peso e comprimento aquando da realização da prova de função respiratória se infere que as crianças do centro de Lisboa eram mais velhas, mais compridas e mais pesadas que as provenientes de Londres, embora as diferenças não fossem estatisticamente significativas. Após ajuste para a idade e sexo, não havia diferenças significativas para o peso e comprimento, expressos em Z-scores (Tabela VIII).

Quanto aos dados da avaliação funcional respiratória obtidas entre os dois subgrupos, o valor médio da capacidade vital forçada era superior nas crianças portuguesas, mas após correcção para a idade, sexo, comprimento e tabagismo materno na gravidez, expresso em Z-scores, não havia diferenças entre os dois grupos (Tabela VIII).

Do mesmo modo, não havia diferenças significativas nos Z-scores obtidos para os débitos expiratórios forçados em volume aumentado (FEF_{75} , FEF_{25-75}) para o débito máximo à capacidade vital forçada ($V'_{\max FRC}$) nem nos parâmetros obtidos em volume corrente (frequência respiratória, volume corrente ajustado para o peso e razão entre o tempo para atingir o *peak expiratory flow* e tempo expiratório [t_{PEF}/t_E]), entre os dois grupos (Tabela VIII).

Deste modo, foi possível combinar os dados dos dois centros e analisá-los como um todo na comparação com o grupo de crianças com sibilância recorrente.

Tabela VIII – Comparação dos dados antropométricos e dados de função respiratória entre os subgrupos de crianças saudáveis: Lisboa e Londres.

Na data do teste	Lisboa (n=12)	Londres (n=18)	Diferença Média (95%IC)	Valor p
Idade, semanas	58,6 (10,9)	52,7 (20,2)	5,8 (-7,3; 18,9)	0,4
Peso, kg	10,0 (0,9)	9,5 (1,3)	0,5 (-0,4; 1,4)	0,3
Peso, Z-score	-0,5 (0,9)	-0,2 (1,0)	-0,3 (-1,0; 0,4)	0,4
Comprimento, cm	77,5 (1,7)	76,0 (5,1)	1,5 (-2,1; 4,9)	0,4
Comprimento, Z-score	0,1 (0,8)	0,7 (1,2)	-0,7 (-1,6; 0,3)	0,2
Parâmetros função respiratória				
FVC, ml	516,3 (94,7) ^a	421,7 (87,4)	94,6 (23,8; 165,4)	0,01*
FVC Z-score	0,5 (0,8) ^a	-0,3 (1,5)	0,8 (-0,2; 1,8)	0,1
FEV _{0,5} , ml	344,3 (50,9) ^a	315,2 (47,1)	29,1 (-9,1; 67,2)	0,1
FEV _{0,5} Z-score	-0,6 (1,0) ^a	-0,2 (1,0)	-0,4 (-1,1; 0,5)	0,4
FEF ₇₅ , ml/s	335,6 (67,2) ^a	301,4 (57,6)	34,2 (-13,9; 82,3)	0,2
FEF ₇₅ Z-score	-0,6 (0,67) ^a	-0,9 (0,88)	0,3 (-0,3; 1,0)	0,3
FEF ₂₅₋₇₅ , ml/s	554,7 (92,4) ^a	553,4 (92,4)	1,32 (-71,2; 73,9)	1,0
FEF ₂₅₋₇₅ Z-score	-1,2 (0,79) ^a	-0,9 (0,82)	-0,3 (-0,9; 0,4)	0,4
V _{maxFRC} , ml	168,8 (63,8)	160,0 (62,6)	8,7 (-39,5; 56,8)	0,7
V _{maxFRC} Z-score	-1,5 (0,9)	-1,5 (0,9)	-0,1 (-0,6; 0,7)	0,8
Freq. respiratória, cpm	29,7 (1,4)	30,4 (6,0)	-0,7 (-5,0; 3,7)	0,8
V _T /kg, ml	10,4 (5,2)	9,6 (1,6)	0,9 (-0,3; 2,0)	0,1
t _{PTEF} /t _E	0,31 (0,09)	0,27 (0,08)	0,04 (-0,24; 0,10)	0,2

cpm=ciclos por minuto ^a n=11 *estatisticamente significativo, p<0,05. Os dados estão apresentados como média (desvio padrão) para variáveis contínuas (teste *t de Student*).

3.2.2. Comparação entre o grupo de crianças com sibilância recorrente e o grupo de crianças saudáveis

Comparando as crianças com sibilância recorrente (n=50) com as crianças do grupo controlo (n=30) verificou-se que as segundas apresentavam uma idade gestacional ao nascer significativamente superior às crianças com sibilância recorrente (-0,6 [-1,0; -0,09], p=0,02). No entanto, não havia diferenças significativas nos restantes parâmetros analisados: sexo, peso ao nascer, peso ao nascer em Z-scores e tabagismo materno na gravidez, embora a percentagem de mães fumadoras na gravidez fosse superior nas crianças sibilantes (Tabela IX).

Tabela IX - Comparação dos dados antropométricos à nascença entre o grupo de crianças com sibilância recorrente e o grupo de crianças saudáveis.

	Crianças Sibilantes (n=50)	Crianças Saudáveis (n=30)	Diferença Média (95% IC) Sibilantes - Saudáveis	Valor p
n (% sexo masculino)	32 (64 %)	18 (60%)		0,7
Idade gestacional, semanas	39,0 (1,0)	39,6 (1,0)	-0,6 (-1,0; -0,09)	0,02*
Peso ao nascer, kg	3,3 (0,4)	3,3 (0,4)	0,02 (-0,2; 0,2)	0,8
Peso nascer em Z-score	0,1 (0,9)	-0,2 (0,8)	0,3 (-0,1; 0,7)	0,1
Tabagismo materno na gravidez, n (%)	14 (28%)	5 (17%)		0,2

*estatisticamente significativo, p<0,05. Os dados estão apresentados como média (desvio padrão) para variáveis contínuas (teste *t Student*) e n (%) para variáveis de categoria (teste χ^2).

Aquando da realização das provas funcionais respiratórias, as crianças sibilantes eram mais velhas, mais compridas e mais pesadas do que as crianças do grupo controlo. No entanto, após correcção para idade e sexo, expresso em Z-scores, apenas as diferenças no peso em Z-scores (0,7 [0,2; 1,3], p=0,01) se mantiveram estatisticamente significativas (Tabela X).

Tabela X - Comparação dos dados antropométricos na data do teste e dados de função respiratória entre as crianças sibilantes e as crianças saudáveis.

Na data do teste	Crianças Sibilantes (n=50)	Crianças Saudáveis (n=30)	Diferença Média (95% IC) Sibilantes - Saudáveis	Valor p
Idade, semanas	63,2 (16,6)	55,1 (17,1)	8,1 (0,4;15,9)	0,04*
Peso, kg	11,1 (1,8)	9,7 (1,2)	1,4 (0,7; 2,2)	0,0001*
Peso, Z-score	0,44 (1,3)	-0,28 (1,0)	0,7 (0,2; 1,3)	0,01*
Comprimento, cm	79,8 (5,4)	76,7 (4,6)	3,2 (0,8; 5,5)	0,01*
Comprimento, Z-score	0,7 (1,2)	0,5 (1,2)	0,2 (-0,3; 0,8)	0,4
Parâmetros de função respiratória				
FVC, ml	466,6 (101,7) ^a	457,6 (100,1) ^b	9,0 (-39,1 ; 57,3)	0,7
FVC Z-score	-0,7 (1,1) ^a	-0,03 (1,3) ^b	-0,7 (-1,2 ; -0,1)	0,01*
FEV _{0,5} , ml	319,5 (62,7) ^a	326,2 (49,8) ^b	-6,7 (-34,3; 20,9)	0,7
FEV _{0,5} Z-score	-1,4 (1,1) ^a	-0,4 (1,0) ^b	-1,0 (-1,5; -0,5)	0,0001*
FEF ₇₅ , ml/s	288,3 (76,4) ^a	314,4 (62,5) ^b	-26,0 (-60,0; 8,0)	0,1
FEF ₇₅ Z-score	-1,4(0,9) ^a	-0,8 (0,8) ^b	-0,6 (-1,0; -0,2)	0,0001*
FEF ₂₅₋₇₅ , ml/s	507,4 (112,6) ^a	553,9 (90,8) ^b	-46,5 (-96,3; 3,4)	0,1
FEF ₂₅₋₇₅ Z-score	-1,80 (0,9) ^a	-1,00 (0,8) ^b	-0,8 (-1,2; -0,4)	0,0001*
V _{maxFRC} , ml	153,2 (69,2)	166,6 (62,0)	-10,3 (-41,0; 20,3)	0,5

V _{maxFRC} Z-score	-1,9 (1,0)	-1,5 (0,9)	-0,4 (-0,89; 0,1)	0,1
Freq. respiratória, cpm	29,9 (6,8)	30,2 (5,6)	-0,3 (-3,2; 2,7)	0,9
V _T /kg, ml	9,9 (1,2)	9,9 (1,5)	-0,1 (-0,7 ; 0,6)	0,9
t _{PTEF} /t _E	0,251 (0,1)	0,285 (0,1)	-0,03 (-0,1; 0,01)	0,2

Os dados estão apresentados como média (desvio padrão) para variáveis contínuas (teste *t de Student*).

cpm= ciclos por minuto; ^a n=44; ^b n=29; *estatisticamente significativo, p<0,05.

Da avaliação dos parâmetros de função respiratória destaca-se que o valor médio da FVC, expresso em Z-scores, era significativamente inferior nas crianças sibilantes, em relação às crianças saudáveis (-0,7 [-1,2; -0,1], $p=0,01$) - (Tabela X).

O grupo das crianças sibilantes apresentava, de igual modo, valores significativamente inferiores em Z-scores, em relação ao grupo controlo, para FEV_{0.5} (-1,0 [-1,5; -0,5], $p=0,0001$), FEF₇₅ (-0,6 [-1,0; -0,23], $p=0,0001$) e FEF₂₅₋₇₅ (-0,8 [-1,2; -0,4], $p=0,0001$). Apresentavam medições em volume corrente e $V'_{\max\text{FRC}}$ Z-scores similares (Tabela X).

3.2.3. Comparação entre os subgrupos de crianças com sibilância recorrente (alto risco e baixo risco para asma) e o grupo de crianças saudáveis

a) Comparação entre o subgrupo de crianças sibilantes com alto risco para asma e o grupo de crianças saudáveis

As crianças sibilantes com alto risco para asma nasceram com idade gestacional inferior ao grupo de crianças saudáveis (-0,7 [-1,4; -0,1], $p=0,03$) mas com peso superior, expresso em Z-scores (0,5 [0,01; 1,0], $p=0,04$). Não havia diferenças no que concerne ao sexo nem ao tabagismo materno na gravidez (Tabela XI).

Na ocasião dos testes de função respiratória, o subgrupo de alto risco apresentava um peso expresso em Z-scores (corrigido para a idade e sexo) significativamente superior (1,0 [0,3; 1,8], $p=0,01$) às crianças saudáveis, não se registando diferenças na idade nem no comprimento expresso em Z-scores (corrigido para idade e sexo).

Quanto aos parâmetros de função respiratória, o subgrupo de alto risco apresentava valores expressos em Z-scores (corrigidos para idade, sexo, comprimento e tabagismo materno na gravidez) significativamente mais baixos que as crianças saudáveis para FVC (-1,2 [-1,9; -0,4], $p=0,005$), FEV_{0.5} (-1,4 [-2,1; -0,8], $p=0,0001$), FEF₇₅ (-1,0 [-1,5; -0,3], $p=0,004$), FEF₂₅₋₇₅ (-1,2 [-1,8; -0,6], $p=0,0001$) e $V'_{\max\text{FRC}}$ (-0,7 [-1,3; -0,1], $p=0,02$). Não se registaram diferenças nos parâmetros obtidos em volume corrente (frequência respiratória, volume corrente ajustado para o peso e razão entre o tempo para atingir o *peak expiratory flow* e tempo expiratório [$t_{\text{PTEF}}/t_{\text{E}}$] (Tabela XI).

b) Comparação entre o subgrupo de crianças sibilantes com baixo risco para asma e o grupo de crianças saudáveis

Não se verificaram diferenças entre o grupo de crianças sibilantes com baixo risco de asma e o grupo controle, nos dados referentes a idade gestacional e peso ao nascer, sexo e tabagismo materno durante a gravidez (Tabela XI). No entanto, o primeiro grupo era significativamente mais velho na altura das provas de função respiratória (9,5 [1,0; 18], $p=0,03$) e significativamente mais pesado, quando expresso em Z-scores (corrigido para idade e sexo) - (0,6 [0,04; 1,1], $p=0,04$). Não se verificaram diferenças significativas para o comprimento, quando expresso em Z-scores, embora em termos absolutos fosse superior nas crianças sibilantes de baixo risco para asma (3,2 [0,7; 5,8], $p=0,02$) - (Tabela XI).

O subgrupo de crianças sibilantes com baixo risco de asma apresentava valores de Z-scores (corrigidos para idade, sexo, comprimento e tabagismo materno na gravidez) significativamente mais baixo que o grupo controle, para FEV_{0,5} (-0,8 [-1,3; -0,3], $p=0,005$), FEF₇₅ (-0,4 [-0,8; -0,04], $p=0,03$) e FEF₂₅₋₇₅ (-0,6 [-1,0; -0,2], $p=0,007$). Não foram encontradas diferenças nos valores de FVC, $V'_{\max\text{FRC}}$, nem nos parâmetros obtidos em volume corrente (frequência respiratória, volume corrente ajustado para o peso e razão entre o tempo para atingir o *peak expiratory flow* e tempo expiratório [$t_{\text{PTEF}}/t_{\text{E}}$] (Tabela XI).

3.2.4. Comparação entre os subgrupos de crianças com sibilância recorrente: alto risco e baixo risco para asma

Os subgrupos de crianças sibilantes de alto risco e baixo risco para asma, não apresentavam diferenças significativas entre si quer nos seus antecedentes (sexo, idade gestacional ao nascer, peso ao nascer e tabagismo materno na gravidez), quer nas medições antropométricas (idade, peso e comprimento) na ocasião da prova de função respiratória (Tabela XI). O subgrupo de alto risco apresentava Z-scores significativamente mais baixos do que o grupo de baixo risco para a FVC (-0,7 [-1,4; -0,04], $p=0,04$) e FEF₂₅₋₇₅ (-0,6 [-1,2; -0,1], $p=0,03$), não havendo diferenças nos seguintes parâmetros: FEV_{0,5}, FEF₇₅, $V'_{\max\text{FRC}}$ ou nos parâmetros obtidos em volume corrente (frequência respiratória, V_t/Kg e $t_{\text{PTEF}}/t_{\text{E}}$ (Tabela XI).

Tabela XI - Comparação dos dados antropométricos (à nascença e na data do teste) e dados de função respiratória entre as crianças sibilantes de alto e baixo risco de asma e as crianças saudáveis.

	Sub-grupo de crianças			Diferença Média (95% IC) entre os subgrupos		
	Controlos Saudáveis (n=30)	Crianças de alto risco para asma (n=17)	Crianças de baixo risco para asma (n=33)	Alto risco-Saudáveis	Baixo risco-Saudáveis	Alto risco-Baixo risco
Sexo masc. n (%)	18 (60%)	9 (53%)	23 (70%)	p=0,6	p=0,4	p=0,5
Idade gest.,semanas.	39,6 (1,0)	38,9 (1,1)	39,0 (0,9)	-0,7 (-1,4; -0,1) p=0,03*	-0,5 (-1,0; 0,01) p=0,06	-0,2 (-0,8; 0,4) p=0,4
Peso nascer, kg	3,3 (0,4)	3,4 (0,5)	3,3 (0,4)	0,1 (-0,2; 0,3) p=0,5	-0,01 (-0,2; 0,2) p=0,9	0,1 (-0,1; 0,3) p=0,4
Peso nascer em Z-scores	-0,2 (0,8)	0,3 (0,9)	0,1 (0,8)	0,5 (0,01; 1,0) p=0,04*	0,2 (-0,2 ; 0,6) p=0,4	0,36 (-0,2; 0,9) p=0,2
Tabagismo materno gravidez n(%)	5 (17%)	6(35%)	8(24%)	p=0,2	p=0,5	p=0,4

Na data do teste						
Idade, semanas	55,1 (17,1)	60,6 (16,9)	64,6 (16,6)	5,5 (-4,9; 15,9) p=0,3	9,5 (1,0; 18,0) p=0,03*	-4,0 (-14,0; 6,0) p=0,4
Peso, kg	9,7 (1,2)	11,2 (2,2)	11,0 (1,6)	1,5 (0,6; 2,55) p=0,003*	1,4 (0,7; 2,0) p=0,0001*	0,20 (-0,9; 1,3) p=0,7
Peso, Z-score	-0,3 (1,0)	0,7 (1,6)	0,3 (1,1)	1,0 (0,3; 1,8) p=0,01*	0,6 (0,04; 1,1) p=0,04*	0,4 (-0,4; 1,2) p=0,3
Comprimento, cm	76,7 (4,6)	79,8 (5,6)	79,9 (5,4)	3,0 (0,1; 6,1) p=0,05	3,2 (0,7; 5,8) p=0,02*	-0,1 (-3,4; 3,2) p=1,0
Comprimento, Z-score	0,5 (1,2)	1,0 (1,4)	0,6 (1,2)	0,5 (-0,2; 1,3) p=0,2	0,1 (-0,5; 0,7) p=0,8	0,4 (-0,3; 1,2) p=0,24
Parâmetros de função respiratória						
FVC, ml	457,6 (100,1) ^a	431,4 (116,9) ^b	484,9 (89,6) ^c	-26,1 (-94,2; 41,9) p=0,4	27,3 (-22,7; 77,3) p=0,3	-53,4 (-117,3; 10,5) p=0,1
FVC Z-score	-0,03 (1,3) ^a	-1,2 (1,0) ^b	-0,5 (1,0) ^c	-1,2 (-1,9; -0,4) p=0,005*	-0,5 (-1,1; 0,2) p=0,2	-0,7 (-1,4; -0,04) p=0,04*
FEV _{0,5} , ml	326,2 (49,8) ^a	297,9 (78,3) ^b	330,7 (50,9) ^c	-28,3 (-67,4; 10,7) p=0,2	4,5 (-22,0; 31,0) p=0,8	-32,8 (-72,2; 6,6) p=0,1
FEV _{0,5} Z-score	-0,4 (1,0) ^a	-1,8 (1,0) ^b	-1,1 (1,1) ^c	-1,4 (-2,1; -0,8) p=0,0001*	-0,8 (-1,3; -0,3) p=0,005*	-0,7 (-1,3; 0,01) p=0,1
FEF ₇₅ , ml/s	314,4 (62,5) ^a	274,3 (113,2) ^b	295,6 (48,9) ^c	-40,10 (-93,3; 13,1) p=0,2	-18,8 (-48,3; 10,8) p=0,2	-21,4 (-70,5; 7,8) p=0,4

FEF ₇₅ Z-score	-0,8 (0,8) ^a	-1,7 (1,2) ^b	-1,3 (0,7) ^c	-1,0 (-1,5; -0,3) p=0,004*	-0,4 (-0,8; -0,04) p=0,03*	-0,5 (-1,1; 0,1) p=0,1
FEF ₂₅₋₇₅ , ml/s	553,9 (90,8) ^a	471,8 (160,9) ^b	525,8 (74,2) ^c	-82,1 (-158,3; -5,8) p=0,04	-28,0 (-71,7; 15,6) p=0,2	-54,0 (-125,2; 17,1) p=0,1
FEF ₂₅₋₇₅ , Z-score	-1,00 (0,8) ^a	-2,2 (1,1) ^b	-1,6 (0,8) ^c	-1,2 (-1,8; -0,6) p=0,0001*	-0,6 (-1,0; -0,2) p=0,007*	-0,6 (-1,2; -0,1) p=0,03*
V _{maxFRC} , ml	166,6 (62,0)	135,7 (67,6)	162,3 (69,3)	-27,8 (-67; 11,4) p=0,2	-4,3 (-34,6; 32,0) p=0,9	-26,5 (-67,8; 14,7) p=0,2
V _{maxFRC} Z-score	-1,5 (0,9)	-2,2 (1,0)	-1,7 (1,0)	-0,7 (-1,3; -0,1) p=0,02*	-0,2 (-0,7; 0,3) p=0,4	-0,5 (-1,1; 0,1) p=0,1
Freq, Respiratória, cpm	30,2 (5,6)	30,4 (8,3)	29,7 (6,0)	0,2 (-3,9; 4,3) p=0,9	-0,5(-3,4; 2,4) p=0,7	0,7 (-3,4; 4,8) p=0,7
V _T /kg, ml	9,9 (1,5)	10,0 (1,5)	9,8 (1,1)	0,1 (-0,8 ; 1,1) p=0,8	-0,1 (-0,8; 0,5) p=0,7	0,3 (-0,5; 1,0) p=0,5
t _{PTEF} /t _E	0,29 (0,1)	0,24 (0,1)	0,26 (0,1)	-0,04 (-0,10; 0,01) p=0,1	-0,03 (-0,10; 0,10) p=0,2	-0,01(-0,10; 0,04) p=0,6

cpm= ciclos por minuto; ^a n=29; ^b n=15; ^c n=29 *estatisticamente significativo, p<0,05.

Os dados estão apresentados como média (desvio padrão) para variáveis contínuas (teste *t Student*) e n (%) para variáveis de categoria (teste χ^2).

Nas figuras 23 e 24 apresentam-se graficamente os parâmetros de função respiratória que permitiram inferir diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos de crianças sibilantes em estudo.

São apresentados os valores em Z-scores e em função dos grupos em estudo para a capacidade vital forçada-FVC (Figura 23) e para os débitos médios FEF₂₅₋₇₅ (Figura 24).

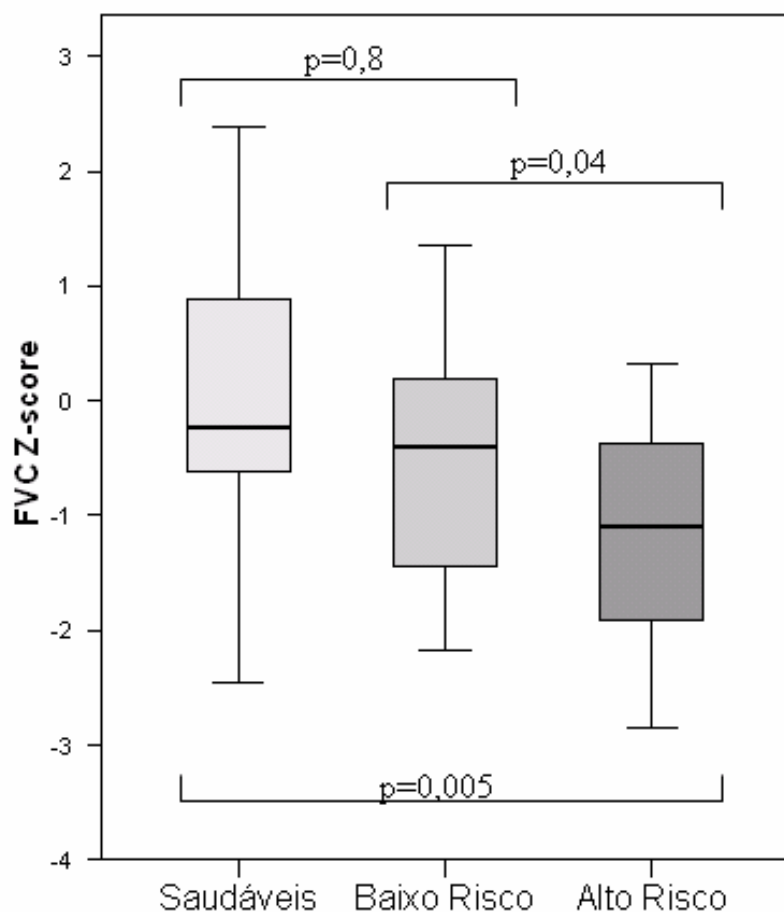


Figura 23 - Comparação dos valores de Z-scores para a FVC entre crianças saudáveis e crianças sibilantes de alto e para baixo risco de asma brônquica.

Na avaliação da FVC (Figura 23) fica claro que não existiam diferenças na média da FVC entre as crianças saudáveis e as crianças sibilantes de baixo risco, sendo porém claras as diferenças entre estas e as crianças de sibilantes de alto risco, bem como entre as de alto risco e as saudáveis.

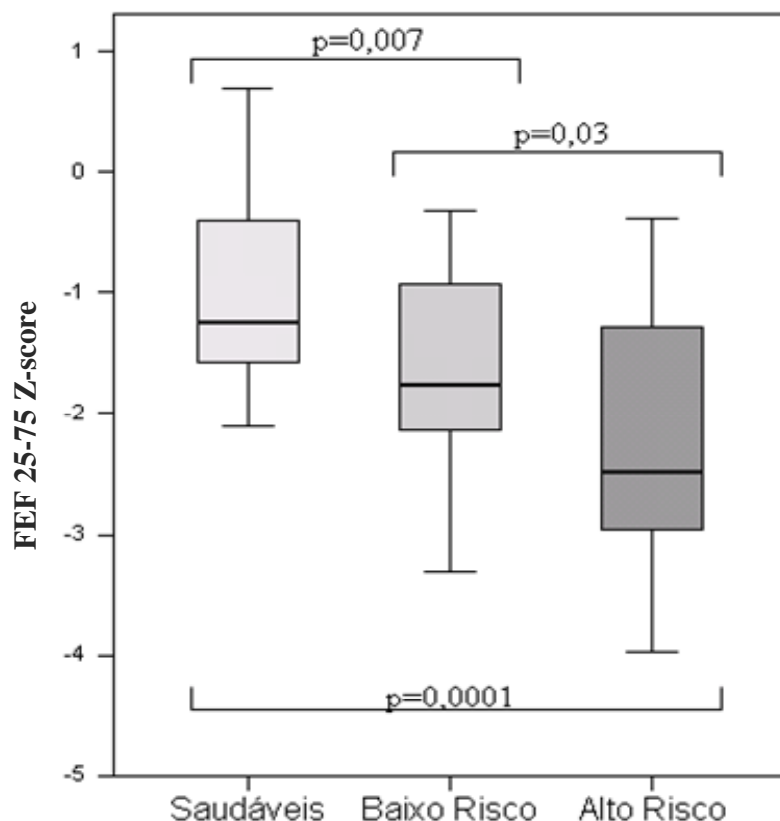


Figura 24 - Comparação dos valores de Z-scores para os débitos médios entre crianças saudáveis e crianças sibilantes de alto e de baixo risco para asma brônquica.

Pela análise dos dados obtidos referente a FEF_{25-75} (Figura 24), conclui-se que se trata do único parâmetro funcional respiratório em que existiam diferenças evidentes na comparação entre qualquer grupo de crianças deste estudo.

As associações entre parâmetros de função respiratória e sibilância recorrente, com e sem alto risco para asma brônquica definido pelo índice preditivo, foram avaliadas por regressão linear múltipla após ajuste para os possíveis factores de confundimento em análise univariada, incluindo o sexo, Z-score do peso, idade e comprimento na data do teste, e ainda tabagismo materno durante a gravidez.

Após ajuste para estas variáveis, a média (95% intervalo de confiança) da FVC era 42 (6; 78) ml inferior nas crianças com sibilância recorrente em relação aos controlos; nos rapazes era 57 (21; 92) ml superior que nas raparigas, havendo um aumento de 26 (5; 48) ml por unidade de Z-score para o peso ao nascer.

Dentro dos subgrupos de crianças sibilantes, a FVC encontrava-se reduzida em 45 (2; 89) ml no grupo de alto risco em comparação com o grupo de baixo risco.

Os valores de FEV_{0,5} eram significativamente mais baixos nas crianças sibilantes em relação ao grupo controlo (-30 [-54; -6]) ml e também 25 (-56; 7) ml inferior no grupo de alto risco em relação ao grupo de baixo risco, apesar de não se verificar uma diferença estatisticamente significativa.

A existência de sibilância estava também associada a reduções significativas de FEF₇₅ (-42 [-75; -10]) mls⁻¹ e FEF₂₅₋₇₅ (-70 [-117; -23]) mls⁻¹.

Após ajuste para todos os restantes factores, o tabagismo materno durante a gravidez não teve efeito significativo no FEF₂₅₋₇₅ (diferença entre fumadoras e não fumadoras: -31 [-84; 23]) mls⁻¹). Quando a regressão múltipla foi limitada às crianças sibilantes (n=44), não havia diferenças no FEF₂₅₋₇₅ entre as crianças de alto e baixo risco (-47 [-115; 20]) mls⁻¹, mas o FEF₂₅₋₇₅ era significativamente inferior (-78 [-149; -8]) mls⁻¹ nas crianças cujas mães foram fumadoras durante a gravidez.

Após ajustamento para a idade, sexo e características antropométricas das crianças, nem a existência de sibilância, nem a existência de tabagismo materno na gravidez tiveram qualquer efeito nos valores de V_{maxFRC} independentemente de ser analisada toda a população ou somente o subgrupo de crianças sibilantes.

Apesar de se ter registado uma tendência, embora sem significado estatístico, para o aumento de peso desde o nascimento ser maior nas crianças sibilantes em relação às saudáveis (0,4 [-0,1; 0,1]), a análise da variação do peso em Z-scores desde o nascimento até à realização das provas de função respiratória, condicionou apenas a ocorrência de variações mínimas na avaliação das associações referidas anteriormente.

3.3. Avaliação Laboratorial

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as crianças sibilantes e as crianças saudáveis que participaram no estudo laboratorial, no que concerne a distribuição por sexo, idade, exposição ao fumo do tabaco na gravidez e índice positivo para exposição tabágica, apesar das crianças sibilantes apresentarem valores superiores às crianças saudáveis em todos os parâmetros avaliados, com excepção da idade (Tabela XII).

Refira-se que a respeito da exposição tabágica, apesar da inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, as crianças saudáveis apresentavam valores de cotinina urinária bastante inferiores às crianças sibilantes.

Tabela XII - Comparação dos dados antropométricos e dados sobre exposição tabágica entre as crianças sibilantes e as crianças saudáveis.

	Crianças Sibilantes (n=50)	Crianças Saudáveis (n=30)	Diferença Média (95% IC) Sibilantes-Saudáveis	Valor p
Sexo masculino, n (%)	32 (64 %)	22 (73 %)		0,4
Tabagismo materno na gravidez, n (%)	14 (28%)	5 (17%)		0,2
Idade, semanas	63,2 (16,6)	66,2 (16,7)	-3,57 (-11,2; 4,0)	0,4
Índice positivo para exposição tabágica, n (%)	25 (50%)	8 (26,7%)		0,06
Cotina urinária, $\mu\text{mol/ml}$.	16,2 (21,5)	9,4 (11,9)	6,8 (-1,7; 15,3)	0,1

Os dados estão apresentados como média (desvio padrão) variáveis contínuas (teste *t de Student*) e n (%) para variáveis de categoria (teste χ^2).

Do mesmo modo, não se inferiram diferenças nas mesmas avaliações para a comparação entre os subgrupos de crianças de alto risco e baixo risco para asma e as crianças saudáveis, conforme se ilustra na tabela XIII.

Saliente-se na avaliação destes resultados que apesar das crianças de alto risco para asma não apresentarem um maior índice de exposição tabágica em relação às restantes, os valores de cotinina urinária eram bastante superiores, embora como referido, sem significância estatística.

Refira-se que se obteve uma concordância entre os valores obtidos para a cotinina urinária superiores a $15\mu\text{mol/ml}$ e a resposta afirmativa de tabagismo activo materno no questionário efectuado.

Tabela XIII – Comparação dos dados antropométricos e dados sobre exposição tabágica entre as crianças sibilantes de alto e baixo risco para asma e as crianças saudáveis.

	Sub-grupo de crianças			Diferença Média (95% IC) entre os subgrupos		
	Controlos Saudáveis (n=30)	Crianças de alto risco para asma (n=17)	Crianças de baixo risco para asma (n=33)	Alto risco–Saudáveis	Baixo risco–Saudáveis	Alto risco-Baixo risco
Sexo masculino, n (%)	22 (73%)	9 (53%)	23 (70%)	p=0,2	p=0,8	p=0,1
Tabagismo materno na gravidez, n (%)	5 (17%)	6 (35%)	8 (24%)	p=0,2	p=0,5	p=0,4
Idade, semanas	66,2 (16,7)	60,6 (16,9)	64,6 (16,6)	-5,6 (-15,6; 4,5) p=0,3	-2,53 (-10,9; 5,8) p=0,6	-3,1 (-12,9; 6,8) p=0,5
Índice positivo para exposição tabágica, n (%)	8 (27%)	10 (59%)	16 (49%)	p=0,06	p=0,08	p=0,5
Cotina urinária, µmol/ml.	9,4 (11,9)	20,4 (21,2)	14,1 (21,7)	11,0 (-0,2; 22,2) p=0,06	4,6 (-4,7; 13,9) p=0,3	6,4 (-4,6; 17,4) p=0,3

Os dados estão apresentados como média (desvio padrão) para variáveis contínuas (teste *t Student*) e n (%) para variáveis de categoria (teste χ^2).

3.3.1. Doseamento de IgE total e IgE específicas para aeroalergénios e alergénios alimentares

O doseamento de IgE específicas para aeroalergénios e para alergénios alimentares foi apenas quantificável em três crianças sibilantes de alto risco para asma brônquica, apresentando duas delas IgE específicas de classe II (1,8 e 2,5 kU/l) para *Dpt* e uma IgE específica para *Dpt* classe II (3,0 kU/l) e IgE específica para ovo classe I (0,6 kU/l).

Quanto à quantificação de IgE total não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as crianças sibilantes e saudáveis nem entre estas e os subgrupos de alto e baixo risco para asma, conforme se ilustra nas tabelas anexas (Tabela XIV e XV).

Tabela XIV - Comparação dos valores de IgE total entre as crianças sibilantes e as crianças saudáveis.

	Crianças Sibilantes (n=50)	Crianças Saudáveis (n=30)	Diferença Média (95% IC) Sibilantes - Saudáveis	Valor p
IgE total, UI/ml	55,4 (131,5)	23,0 (28,2)	32,4 (-6,6; 71,4)	0,1

Os dados estão apresentados como média (desvio padrão). Variável normal (teste *t de Student*).

Tabela XV – Comparação dos valores de IgE total entre as crianças sibilantes de alto e baixo risco para asma e as crianças saudáveis.

	Sub-grupo de crianças			Diferença Média (95% IC) entre os subgrupos		
	Controlos Saudáveis (n=30)	Crianças de alto risco para asma (n=17)	Crianças de baixo risco para asma (n=33)	Alto risco–Saudáveis	Baixo risco–Saudáveis	Alto risco– Baixo risco
IgE total, UI/ml.	23,0 (28,2)	72,3 (141,0)	47,2 (128,1)	49,3 (-15,7; 114,4) p=0,1	24,2 (-28,8; 77,2) p=0,4	25,2 (-38,9; 89,2) p=0,4

Os dados estão apresentados como média (desvio padrão). Variável normal (teste *t de Student*).

3.3.2. Estudo de populações celulares por citometria de fluxo

3.3.2.1. Comparação entre o grupo de crianças com sibilância recorrente e o grupo de crianças saudáveis

Da avaliação das populações celulares por citometria de fluxo destaca-se que o valor médio do número absoluto de células $CD4^+CD25^{forte}$ nas crianças sibilantes era significativamente inferior ao obtido nas crianças saudáveis (-47,9 [-89,6; 6,1], $p=0,03$) - (Tabela XVI).

O grupo das crianças sibilantes apresentava de igual modo, valores significativamente inferiores reportados em mediana, em relação ao grupo controlo, para $\%CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ ($p=0,0001$) e número absoluto de $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ ($p=0,0001$). Os valores de $\%CD4^+CD25^+$, $\%CD4^+CD25^{forte}$, $\%CD4^+CD25^+GITR^+$, $\%CD4^+CD25^{forte}Foxp3$ bem como o número absoluto das mesmas sub-populações celulares eram similares entre os grupos (com excepção do número absoluto de células $CD4^+CD25^{forte}$), sem diferenças estatisticamente significativas entre as crianças com sibilância e o grupo de crianças saudáveis (Tabelas XVI e XVII).

Tabela XVI – Comparação dos dados de citometria de fluxo entre crianças sibilantes e crianças saudáveis.

Citometria de Fluxo	Crianças Sibilantes (n=50)	Crianças Saudáveis (n=30)	Diferença Média (95% IC) Sibilantes – Saudáveis	Valor p
%CD4 ⁺ CD25 ⁺	15,9 (3,3)	15,2 (2,4)	+0,7 (-0,9; 2,2)	0,4
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ , céls/μl.	505,8 (161,7)	562,8 (147,4)	-57,0 (-128,9; 14,9)	0,1
NCD4 ⁺ CD25 ^{forte} , céls/μl.	247,9 (86,6)	295,8 (97,5)	-47,9 (-89,6; -6,1)	0,03*
%CD4 ⁺ CD25 ^{forte} Foxp3 ⁺	4,4 (2,7)	4,5 (1,6)	-0,04 (-1,1; 1,1)	0,9
NCD4 ⁺ CD25 ^{forte} Foxp3 ⁺ , céls/μl.	144,8 (98,3)	165,2 (68,8)	-20,4 (-22,1; 60,7)	0,4

Os dados estão apresentados como média (desvio padrão)- variáveis normais (teste *t de Student*). Valores absolutos em céls/μl.

*Estatisticamente significativo, p<0,05.

Tabela XVII – Comparação dos dados de citometria de fluxo das crianças sibilantes e crianças saudáveis.

Citometria de Fluxo	Crianças Sibilantes (n=50)	Crianças Saudáveis (n=30)	Valor p
%CD4 ⁺ CD25 ^{forte}	7,5 (2,23)	7,4 (2,3)	0,4
%CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺	0,8 (0,8)	2,8 (3,3)	0,0001*
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺ ,cél/s/μl.	23,9 (30,9)	95,7 (143,5)	0,0001*
%CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺	0,3 (0,8)	0,5 (0,6)	0,3
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺ ,cél/s/μl.	11,5 (27,3)	19,8 (31,2)	0,2

Os dados são apresentados como mediana (amplitude interquartil) - variáveis não normais (teste *Mann-Whitney*); *estatisticamente significativo p<0,05.

3.3.2.2 Comparação entre os subgrupos de crianças com sibilância recorrente: alto risco e baixo risco para asma e o grupo de crianças saudáveis

a) Comparação entre o subgrupo de crianças sibilantes com alto risco para asma e o grupo de crianças saudáveis

O subgrupo de alto risco apresentava valores médios para o número absoluto de CD4⁺CD25⁺ (-137,8 [-230,9; -4,6], p=0,004) e CD4⁺CD25^{forte} (-86,1 [-140,9; -31,3], p=0,002) significativamente inferiores em relação às crianças saudáveis, não se observando diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros obtidos em valores percentuais das mesmas populações (Tabelas XVIII e XX).

Verificaram-se ainda valores significativamente superiores, reportados, em mediana, nos valores percentuais e absolutos da população CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ nas crianças saudáveis em relação às crianças de alto risco (p=0,0001). Não se registaram diferenças nos parâmetros obtidos em valores percentuais das populações CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{forte}, nem nas restantes populações avaliadas em valor percentual ou em valor absoluto (CD4⁺CD25⁺GITR⁺; CD4⁺CD25^{forte}Foxp3⁺), apesar de se ter verificado que o grupo de crianças saudáveis apresentava valores superiores em todos os parâmetros

avaliados em relação ao grupo de crianças de alto risco, com exceção da avaliação percentual da população CD4⁺CD25⁺ (Tabelas XVIII, XIX, XX e XXI).

b) Comparação entre o subgrupo de crianças sibilantes com baixo risco para asma e o grupo de crianças saudáveis

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na avaliação percentual e absoluta da população CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ entre as crianças saudáveis e as crianças com baixo risco de asma, apresentando o primeiro grupo de crianças, valores superiores (p=0,002 e p=0,0001, respectivamente) - (Tabelas XIX e XXI).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as restantes populações celulares avaliadas em citometria de fluxo entre as crianças sibilantes com baixo risco para asma e o grupo de crianças saudáveis, embora estas últimas apresentassem valores superiores em relação às crianças de baixo risco para asma em todos os parâmetros avaliados com exceção da avaliação percentual da população CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{forte} (Tabelas XVIII, XIX, XX e XXI).

3.3.2.3 Comparação entre os subgrupos de crianças com sibilância recorrente: alto risco e baixo risco para asma

O subgrupo de alto risco apresentava valores absolutos nas populações CD4⁺CD25⁺ (-118,8 [-210,0; -27,5], p=0,01) e CD4⁺CD25^{forte} (-56,2 [-109,9; -2,5], p=0,04) significativamente inferiores que o grupo de baixo risco (Tabelas XVIII e XX).

Os subgrupos de crianças sibilantes de alto risco e baixo risco para asma, não apresentaram diferenças significativas entre si em todos os restantes parâmetros avaliados (Tabelas XVIII, XIX, XX e XXI).

Tabela XVIII - Dados de citometria de fluxo das crianças sibilantes de alto e baixo risco para asma e crianças saudáveis (variáveis normais).

Citometria de Fluxo	Alto risco (n=17)	Baixo-risco (n=33)	Crianças Sibilantes (n=50)	Controlos Saudáveis (n=30)
%CD4 ⁺ CD25 ⁺	15,9 (4,9)	15,9 (3,2)	15,9 (3,3)	15,2 (2,4)
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ ,cél/μl.	425,0 (129,2)	543,8 (163,0)	505,8 (161,7)	562,8 (147,4)
NCD4 ⁺ CD25 ^{forte} ,cél/μl.	209,7 (69,8)	265,9 (88,7)	247,9 (86,6)	295,8 (97,5)
%CD4 ⁺ CD25 ^{forte} Foxp3	4,3 (3,1)	4,4 (2,6)	4,4 (2,7)	4,5 (1,6)
NCD4 ⁺ CD25 ^{forte} Foxp3 ⁺ ,cél/μl	120,7 (95,4)	156,0 (99,2)	144,8 (98,3)	164,1 (68,8)

Os dados são apresentados como média (desvio padrão).

Tabela XIX - Dados de citometria de fluxo das crianças sibilantes de alto e baixo risco para asma e crianças saudáveis (variáveis não normais).

Citometria de Fluxo	Alto risco (n=17)	Baixo-risco (n=33)	Crianças Sibilantes (n=50)	Controlos Saudáveis (n=30)
%CD4 ⁺ CD25 ^{forte}	7,31 (2,2)	7,7 (2,3)	7,67 (2,3)	7,40 (2,2)
%CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺	0,88 (0,7)	0,76 (1,2)	0,77 (0,9)	2,84 (3,3)
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺ , céls/μl.	23,9 (31,7)	23,8 (37,3)	23,9 (29,7)	95,7 (143,5)
%CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺	0,40 (0,8)	0,25 (0,6)	0,31 (0,8)	0,54 (0,6)
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺ , céls/μl.	14,2 (27,3)	11,3 (21,7)	11,5 (25,3)	19,8 (31,2)

Os dados são apresentados como mediana (amplitude interquartil).

Tabela XX - Diferença média (95% Intervalo Confiança) em citometria de fluxo: crianças sibilantes de alto e baixo risco para asma *versus* controlos saudáveis

Citometria de Fluxo	Alto Risco-Saudáveis	Baixo Risco -Saudáveis	Alto Risco -Baixo Risco
%CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,6 (-1,4; 2,7)	0,6 (-1,0; 2,3)	0,01 (-2,0; 2,0)
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ , céls/μl.	-137,8 (-230,9; -4,6)** p=0,004	-19,0 (-94,4; 56,4)	-118,8 (-210,0; -27,5)* p=0,01
NCD4 ⁺ CD25 ^{forte} , céls/μl.	-86,1 (-140,9; -31,3)** p=0,002	-29,9 (-74,2; 14,5)	-56,2 (-109,9; -2,5)* p=0,04
%CD4 ⁺ CD25 ^{forte} Foxp3	-0,1 (-1,6; 1,4)	-0,01 (-1,2; 1,2)	-0,1 (-1,59; 1,41)
NCD4 ⁺ CD25 ^{forte} Foxp3, céls/μl	-43,4 (-99,7; 12,9)	-8,1 (-53,0; 36,9)	-35,4 (-91,7; 21,0)

Estatisticamente significativo,*p< 0,05; **p<0,01 . Variáveis normais (teste *t de Student*).

Tabela XXI - Significância estatística dos dados de citometria de fluxo: crianças sibilantes de alto e baixo risco para asma *versus* controles saudáveis

Citometria de Fluxo	Comparação entre subgrupos	Alto Risco -Saudáveis	Baixo Risco-Saudáveis	Alto Risco-Baixo Risco
%CD4 ⁺ CD25 ^{forte}	p=0,4			
%CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺		p=0,0001*	p=0,002*	p=0,9
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺ ,cél/s/μl.		p=0,0001*	p=0,0001*	p=0,7
%CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺	p=0,3			
N CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺ ,cél/s/μl.	p=0,2			

Estatisticamente significativo *p<0,05; Variáveis não normais (teste *Kruskall-Wallis*).

Nos gráficos em anexo encontram-se ilustrados os parâmetros de citometria de fluxo avaliados que permitiram inferir diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de crianças em estudo.

São apresentados os valores em função dos grupos em estudo para a avaliação percentual da população $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ (Figura 25) e para a avaliação do número absoluto das populações celulares $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ (Figura 26), $CD4^+CD25^+$ (Figura 27) e $CD4^+CD25^{forte}$ (Figura 28).

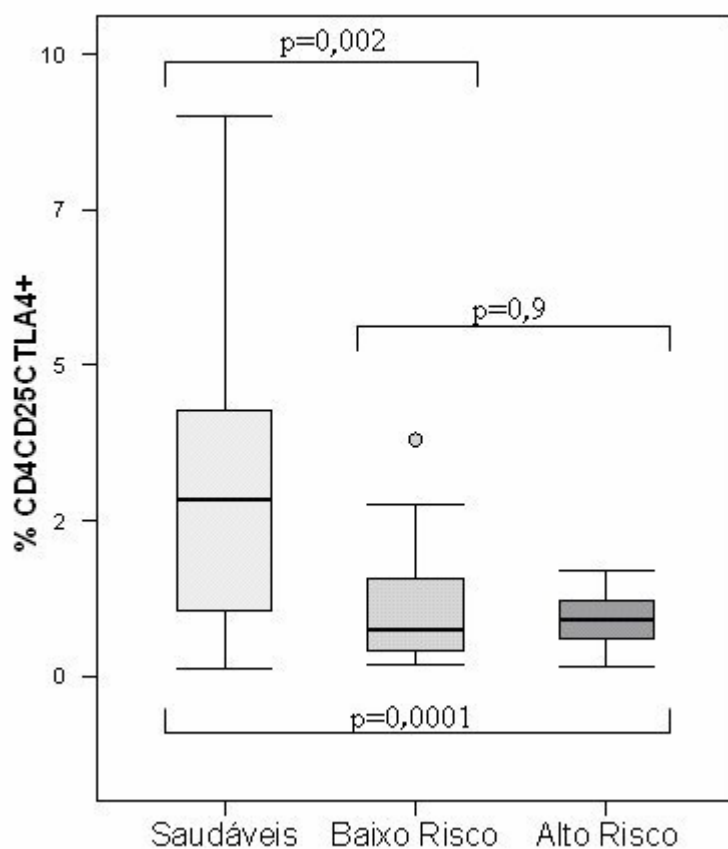


Figura 25 - Comparação dos valores percentuais da população $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ entre crianças saudáveis e crianças sibilantes de alto e de baixo risco para asma brônquica.

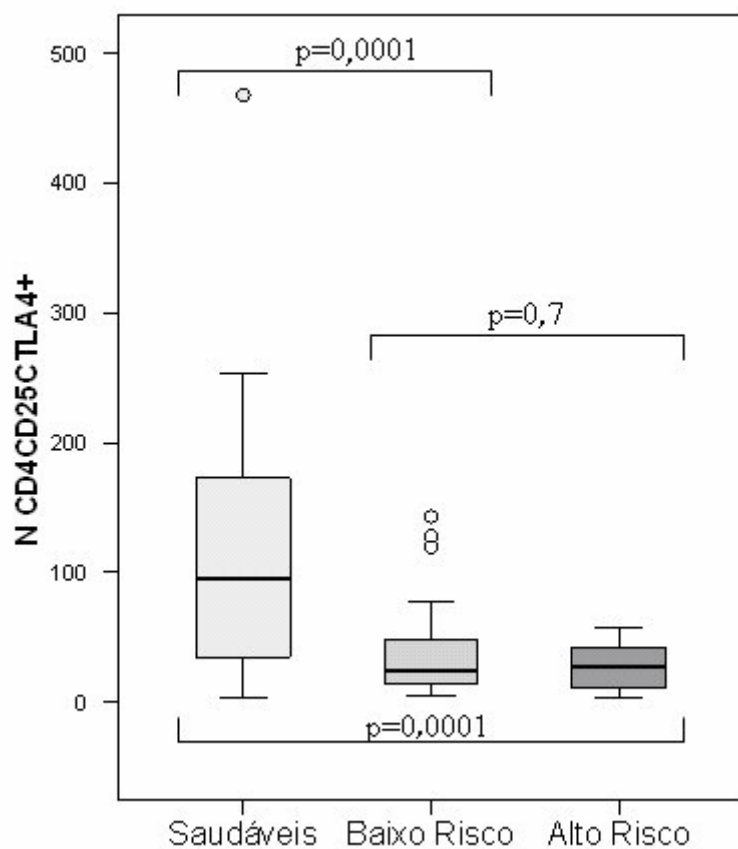


Figura 26 - Comparação dos valores absolutos (cél/μl) da população CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ entre crianças saudáveis e crianças sibilantes de alto e de baixo risco para asma brônquica.

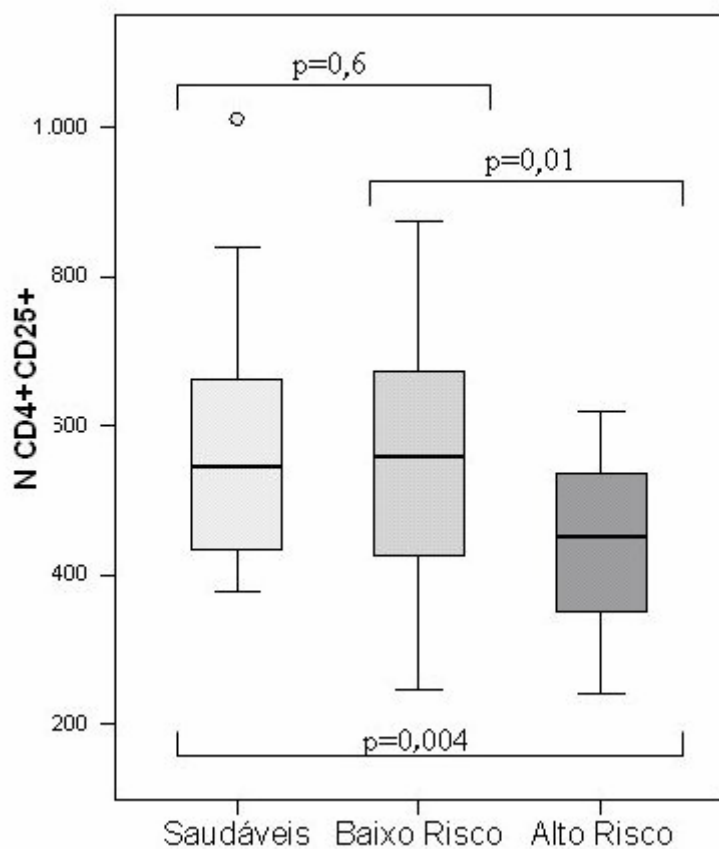


Figura 27 - Comparação dos valores absolutos (célis/ μ l) da população CD4⁺CD25⁺ entre crianças saudáveis e crianças sibilantes de alto e de baixo risco para asma brônquica.

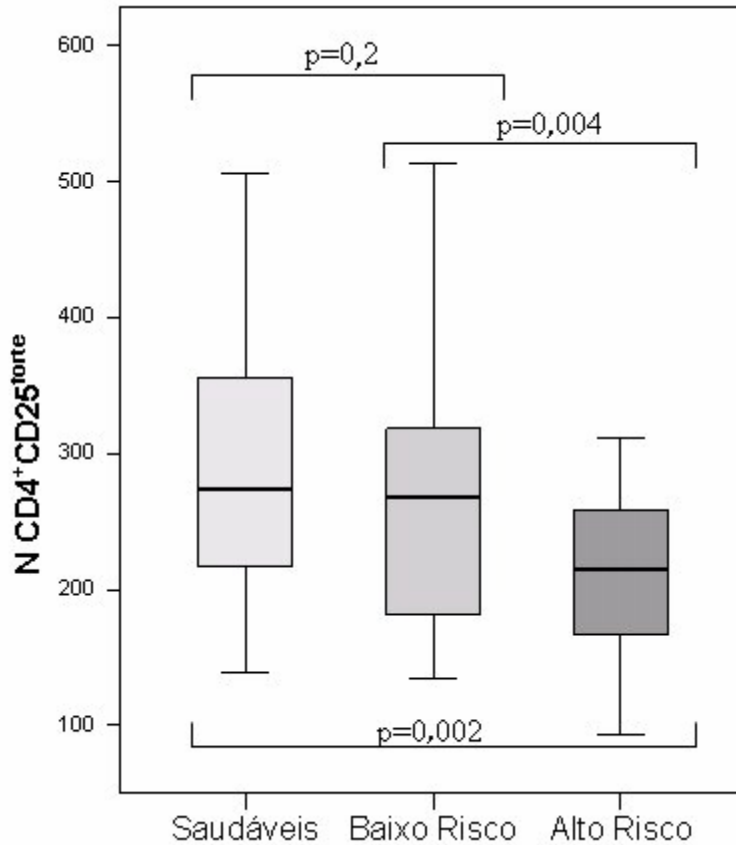


Figura 28 - Comparação dos valores absolutos (célis/ μ l) da população $CD4^+CD25^{forte}$ entre crianças saudáveis e crianças sibilantes de alto e de baixo risco de asma brônquica.

Na avaliação percentual e absoluta da população $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ (Figuras 25 e 26) verificou-se que não existiam diferenças na mediana dos valores obtidos entre as crianças de alto risco e as crianças de baixo risco, havendo no entanto diferenças significativas na comparação entre as crianças saudáveis e as crianças sibilantes de baixo risco, bem como entre as crianças saudáveis e as crianças sibilantes de alto risco.

Quanto à avaliação do número absoluto das populações $CD4^+CD25^+$ (Figura 27) e $CD4^+CD25^{forte}$ (Figura 28) verificou-se em ambos os casos, serem os únicos parâmetros avaliados em citometria de fluxo que permitiram estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de crianças sibilantes de alto risco e de baixo risco de asma. Refira-se que nestas avaliações também se observaram diferenças entre o grupo de crianças saudáveis e o grupo de crianças sibilantes com alto risco de asma.

Na avaliação do número absoluto de linfócitos, o subgrupo de crianças de alto risco apresentava os valores mais baixos, sendo encontradas diferenças estatisticamente

significativas entre os subgrupos de alto risco e baixo risco de asma ($p=0,04$), bem como entre o subgrupo de alto risco e o grupo de crianças saudáveis ($p=0,02$), não se documentando diferenças entre o subgrupo de baixo risco de asma e o grupo de crianças saudáveis ($p=0,8$).

Por outro lado, só se documentaram diferenças significativas na avaliação da percentual de linfócitos na comparação entre o subgrupo de crianças de alto risco e o grupo de crianças saudáveis ($p=0,03$), não havendo diferenças na comparação entre os subgrupos de alto risco e baixo risco para asma ($p=0,4$), nem entre o subgrupo de baixo risco e o grupo de crianças saudáveis ($p=0,09$).

As associações entre parâmetros de citometria de fluxo e sibilância recorrente, com e sem alto risco para asma brônquica definido pelo índice preditivo, foram avaliadas por regressão linear múltipla após ajuste para os possíveis factores de confundimento em análise univariada, incluindo o sexo, idade e exposição ao fumo de tabaco, não se encontrando associações significativas para os parâmetros avaliados (avaliação percentual da população $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$, valores absolutos de $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$, $CD4^+CD25^+$ e de $CD4^+CD25^{forte}$), independentemente de ser analisada toda a população ou somente o subgrupo de crianças sibilantes.

3.3.3. Expressão de mARN para citocinas, CTLA-4 e Foxp3 após culturas celulares

3.3.3.1. Comparação entre o grupo de crianças com sibilância recorrente e o grupo de crianças saudáveis

Da avaliação da expressão de mARN após cultura de células mononucleares com PMA e leitura às 24 horas, destaca-se que os valores para a expressão de CTLA-4 e de Foxp3, reportados em mediana, eram significativamente superiores nas crianças saudáveis em relação às crianças com sibilância recorrente (4,7 [4,3] versus 3,2 [1,7], $p=0,03$ e 1,6 [1,8] versus 0,4 [1,3], $p=0,02$, respectivamente), não se verificando diferenças estatisticamente significativas em relação a nenhuma das restantes citocinas avaliadas ($IFN\gamma$, IL-10, TGF- β) - (Tabela XXII).

O grupo das crianças sibilantes apresentava de igual modo, valores significativamente inferiores reportados em mediana, em relação ao grupo controlo, para a expressão de CTLA-4 (-0,4 [1,7] *versus* 0,3 [1,7], p=0,03) e de IFN γ (-0,5 [1,9] *versus* 0,2 [2,4], p=0,04), após cultura de células mononucleares com extractos de ácaros e leitura ao 7º dia, sem diferenças relevantes em relação às restantes moléculas avaliadas (Foxp3, IL-10, TGF- β) - (Tabela XXIII).

Tabela XXII - Comparação da expressão de mARN em culturas celulares com estimulação com PMA e leitura às 24 horas entre crianças sibilantes e crianças saudáveis.

Estimulação inespecífica (PMA 24h)	Crianças Sibilantes (n=50)	Controlos Saudáveis (n=30)	Valor p
CTLA-4 ^(a)	3,2 (1,7)	4,7 (4,3)	0,03*
Foxp3 ^(a)	0,4 (1,3)	1,6 (1,8)	0,02*
IFN γ ^(a)	8,1(4,3)	4,8 (9,8)	0,09
IL10 ^(b)	-1,7 (0,5)	-1,8 (0,5)	0,9
TGF- β ^(a)	1,7 (1,4)	3,7 (2,0)	0,7

^a Variável não-normal. Dados apresentados em mediana (amplitude interquartil) (teste *Mann-Whitney*).

^b Variável normal. Dados apresentados em média (desvio padrão) (teste *t de Student*).

* Estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

Tabela XXIII - Comparação da expressão de mARN em culturas celulares com estimulação com extractos de ácaros e leitura ao 7º dia entre crianças sibilantes e crianças saudáveis.

Estimulação com extractos de ácaros (7º dia)	Crianças Sibilantes (n=50)	Controlos Saudáveis (n=30)	Valor p
CTLA-4 ^(a)	-0,4 (1,7)	0,3 (1,7)	0,03*
Foxp3 ^(b)	0,02 (0,2)	0,06 (0,3)	0,9
IFN γ ^(a)	-0,5 (1,9)	0,2 (2,4)	0,04*
IL10 ^(a)	-0,2 (1,8)	0,3 (2,3)	0,9
TGF- β ^(a)	0,05 (1,1)	-0,2 (1,2)	0,9

^a Variável não-normal. Dados apresentados em mediana (amplitude interquartil) (teste *Mann-Whitney*).

^b Variável normal. Dados apresentados em média (desvio padrão) (teste *t de Student*).

* Estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

3.3.3.2 Comparação entre os subgrupos de crianças com sibilância recorrente, alto risco e baixo risco para asma, e o grupo de crianças saudáveis

Da avaliação da expressão por mARN após cultura de células mononucleares com PMA e leitura às 24 horas, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação a nenhuma das citocinas avaliadas (IFN γ , IL-10, TGF- β), nem em relação ao Foxp3 (Tabelas XXIV e XXV).

O grupo das crianças saudáveis apresentava valores significativamente superiores, reportados em mediana, em relação ao grupo de alto risco para asma, para a expressão de CTLA-4 (0,3 [1,7] *versus* -0,7 [0,9], p=0,01) e para a expressão de IFN γ (0,2 [2,4] *versus* -1,3 [0,8], p=0,003), após cultura de células mononucleares com extractos de ácaros e leitura ao 7º dia, sem diferenças relevantes em relação à expressão de Foxp3, IL-10 e TGF- β (Tabelas XXVI e XXVII).

Por outro lado, não se documentaram diferenças com significado estatístico para a expressão génica de nenhuma citocina nem para a expressão de Foxp3, entre o grupo de crianças saudáveis e o grupo de baixo risco para asma brônquica (Tabelas XXIV e XXV).

Apenas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a expressão de IFN γ , na comparação entre os grupos com alto risco e baixo risco para asma após cultura de células com extractos de ácaros e leitura ao 7º dia, apresentando este último grupo uma expressão significativamente superior (-1,3 [0,8] *versus* -0,1 [2,2], p=0,03) - (Tabelas XXVI e XXVII).

Tabela XXIV – Valores da expressão de mARN em culturas celulares com estimulação com PMA e leitura às 24h entre crianças sibilantes de alto e baixo risco e crianças saudáveis.

Estimulação inespecífica (PMA 24h)	Alto risco [†] (n=17)	Baixo-risco [†] (n=33)	Crianças Sibilantes (n=50)	Controlos Saudáveis (n=30)
CTLA-4 ^(a)	2,9 (1,9)	3,3 (1,4)	3,2 (1,7)	4,7 (4,3)
Foxp3 ^(a)	0,4(1,5)	0,4 (1,3)	0,4 (1,3)	1,6 (1,8)
IFN γ ^(a)	9,5 (4,4)	7,6 (3,3)	8,1(4,3)	4,8 (9,8)
IL-10 ^(b)	-1,5 (1,1)	-1,9 (0,6)	-1,7 (0,7)	-1,9 (0,5)
TGF- β ^(a)	1,6 (1,3)	1,7 (1,4)	1,7 (1,4)	3,7 (2,0)

^a Variável não-normal. Dados apresentados em mediana (amplitude interquartil).

^b Variável normal. Dados apresentados em média (desvio padrão).

Tabela XXV – Significância estatística dos valores de expressão de mARN em culturas celulares com estimulação com PMA e leitura leitura às 24h entre crianças sibilantes de alto e baixo risco e crianças saudáveis.

Estimulação inespecífica (PMA 24h)	Comparação entre subgrupos	Alto risco - Saudáveis	Baixo risco -Saudáveis	Alto risco - Baixo risco
CTLA-4 ^(a)	p=0,07			
Foxp3 ^(a)	p=0,051			
IFN γ ^(a)	p=0,1			
IL-10 ^(b)		p=0,9	p=1,0	p=0,9
TGF- β ^(a)	p=0,9			

^(a) Variável não-normal (teste *Kruskall-Wallis*).

^(b) Variável normal (teste *LSD*).

Tabela XXVI - Valores da expressão de mARN em culturas celulares com estimulação com extractos de ácaros e leitura ao 7º dia entre crianças sibilantes de alto e baixo risco e crianças saudáveis.

Estimulação com extractos de ácaros	Alto risco (n=17)	Baixo-risco (n=33)	Controlos Saudáveis (n=30)
CTLA-4 ^(a)	-0,7 (0,9)	0,01 (1,4)	0,3 (1,7)
Foxp3 ^(b)	-0,3 (0,5)	0,2 (0,3)	0,06 (0,3)
IFN γ ^(a)	-1,3 (0,8)	-0,1 (2,2)	0,2 (2,4)
IL-10 ^(a)	-0,3 (2,0)	0,3 (2,0)	0,3 (2,3)
TGF- β ^(a)	0,2 (0,9)	-0,2 (1,7)	-0,2 (1,2)

^a Variável não-normal. Dados apresentados em mediana (amplitude interquartil).

^b Variável normal. Dados apresentados em média (desvio padrão).

Tabela XXVII – Significância estatística dos valores da expressão de mARN em culturas celulares com estimulação com extractos de ácaros e leitura ao 7º dia entre crianças sibilantes de alto e baixo risco e crianças saudáveis.

Estimulação com extractos de ácaros	Comparação entre subgrupos	Alto risco - Saudáveis	Baixo risco - Saudáveis	Alto risco - Baixo risco
CTLA-4 ^(a)	p=0,03*	p=0,01*	p=0,1	p=0,2
Foxp3 ^(b)		p=0,5	p=0,8	p=0,3
IFN γ ^(a)	p=0,02*	p=0,003*	p=0,2	p=0,03*
IL-10 ^(a)	p=0,7			
TGF- β ^(a)	p=0,4			

^(a) Variável não-normal (teste *Kruskall-Wallis*).

^(b) Variável normal (teste *LSD*).

* Estatisticamente significativo, p<0,05.

Nos gráficos representados seguidamente apresentam-se os resultados da expressão de mRNA para as culturas celulares com extractos de ácaros do pó doméstico, em que se obtiveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de crianças em estudo.

São apresentados em função dos grupos em estudo, os valores da expressão de mRNA para IFN- γ (Figura 29) e para CTLA-4 (Figura 30).

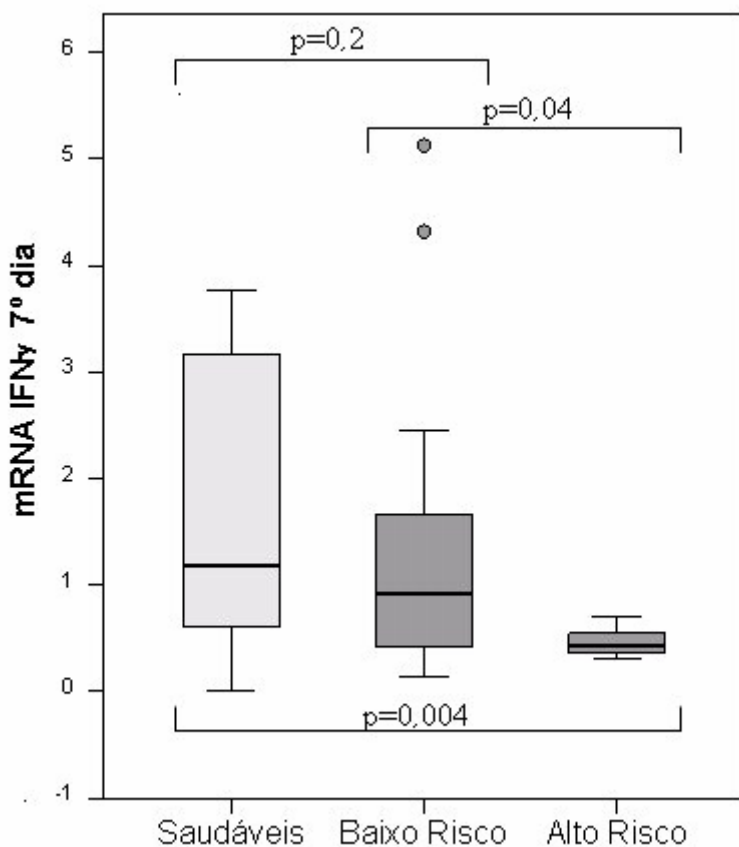


Figura 29 – Comparação da expressão de mRNA para IFN- γ em culturas celulares com estimulação com extractos de ácaros e leitura ao 7º dia entre crianças sibilantes de alto e baixo risco e crianças saudáveis.

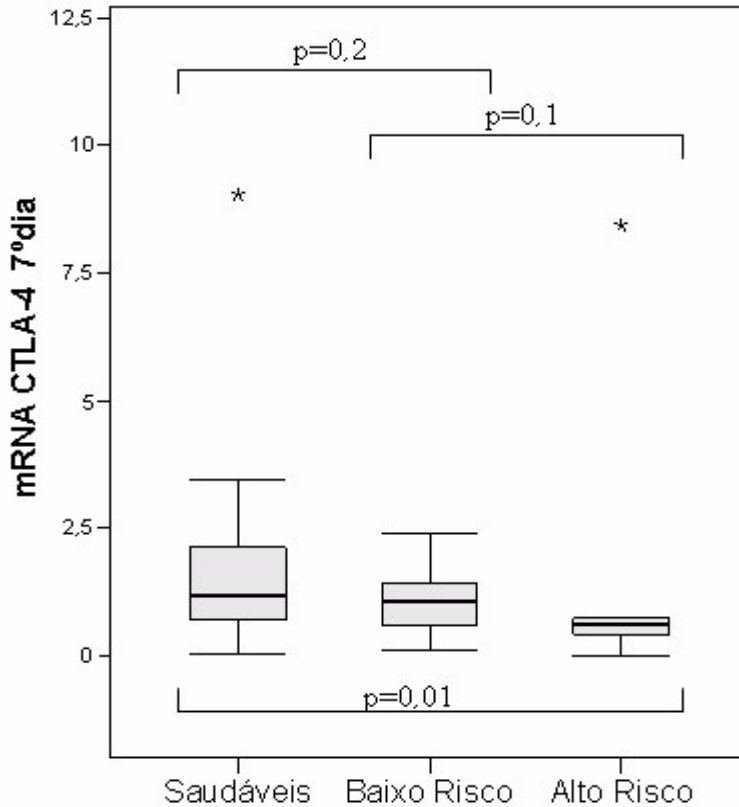


Figura 30 – Comparação da expressão de mARN para CTLA-4 em culturas celulares com estimulação com extractos de ácaros e leitura ao 7º dia entre crianças sibilantes de alto e baixo risco e crianças saudáveis.

Na avaliação da expressão de mARN para IFN- γ (Figura 29) verificou-se que se tratava do único parâmetro que permitiu estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de crianças sibilantes de alto risco e baixo risco para asma, verificando-se também nesta avaliação a existência de diferenças entre o grupo de crianças saudáveis e o grupo de crianças sibilantes de alto risco para asma.

Quanto à avaliação da expressão de mARN para CTLA-4 (Figura 30) verificou-se que apenas existiram diferenças na mediana dos valores obtidos entre as crianças saudáveis e as crianças sibilantes de alto risco.

As associações entre a expressão de mARN e sibilância recorrente, com e sem alto risco para asma brônquica definido pelo índice preditivo, foram avaliadas por regressão linear múltipla após ajuste para os possíveis factores de confundimento em análise univariada, incluindo o sexo, idade e exposição ao fumo de tabaco, não se verificando diferenças

significativas para a expressão de mRNA para IFN- γ nem para a expressão de mRNA para CTLA-4, independentemente de ser analisada toda a população ou somente o subgrupo de crianças sibilantes.

3.3.4. Estudo de polimorfismos

Foram avaliados polimorfismos dos genes ADAM33, GPRA e DPP10, apresentando-se na tabela XXVIII o valor de significância estatística para cada polimorfismo na comparação entre as crianças saudáveis e as crianças sibilantes e na comparação entre as crianças saudáveis, as crianças sibilantes com alto risco para asma e as crianças sibilantes com baixo risco para asma.

Tabela XXVIII - Comparação da expressão de polimorfismos entre crianças de alto risco e baixo risco para asma e crianças saudáveis.

Gene	Referência NCBI*	Referência do fabricante (Applied Biosystem)	Sequência das sondas	Valor de p Saudáveis-sibilantes	Valor de p Entre grupos
ADAM 33	rs528557	C___601719_20	[C/G]CCTGGGAGCAGAGGCAGCAGGACGC	0,8 ^a	0,3 ^a
	rs2280091	C__15969370_10	[A/G]TGGGGTGAACGCCGCCAGGGGGTG	*0,002 ^a	*0,01 ^a
	rs3918392	C__25997586_10	[C/T]TCCTTTCCAGGTGAGCAGCTGCTCC	0,6 ^b	0,3 ^a
	rs3918395	C__11201375_10	[A/C]CGAAACCCTCACCTGAACCTTCCA	0,1 ^b	0,3 ^a
	rs3918396	C___1276547_20	[C/T]GCTGAGGAGCATGGCCAGCAGGAAG	0,2 ^a	0,3 ^a
	rs2787094	C__11201381_1_	[C/G]CAGGGGAGTGTGGACTCAGTCGAAC	0,7 ^a	0,08 ^a
	rs597980	C___1276549_10	[A/G]CAGCTGACCAGTGGTATGGAGTGAA	0,3 ^a	0,4 ^a
GPRA	<u>rs740347</u>	C___540102_10	[C/G]AGCATAAATAATCTGAACAACCCTG	0,2 ^a	0,4 ^a
	<u>rs324377</u>	C___2594474_10	[A/C]AATCACTGCCTTCTGACTTCAACTT	0,01 ^a	0,02 ^a
	<u>rs323922</u>	C___2959829_10	[C/G]TTTCTCAGGAGTCCCTGGGGGAGGT	0,01 ^a	0,05 ^a
DPP 10	rs2053724	C___2147046_10	[C/G]CTCAGAACATCTCCATCCTCACAGT	0,3 ^a	0,3 ^a
	rs35766316	C__25633913_10	[A/G]TATACTGCTTCATATGTGATTTACA	0,5 ^a	0,7 ^a
	rs36044503	C__25633886_20	[A/G]TGAACCCAACAATAAAATTATATGT	0,7 ^a	0,8 ^a

a Teste χ^2 b Teste exacto de Fisher * Estatisticamente significativo $p < 0,05$.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre crianças saudáveis e crianças sibilantes, bem como entre os grupos de alto risco, baixo risco e saudáveis para o polimorfismo do gene ADAM33 (rs2280091) e para o polimorfismo do gene GPRA (rs324377). Para o polimorfismo do gene GPRA (rs323922) apenas foram documentadas diferenças com significado estatístico na comparação entre crianças sibilantes e saudáveis - (Tabela XXVIII).

Pela análise do polimorfismo do gene ADAM 33 em estudo nos diferentes grupos de crianças, evidencia-se que a grande maioria das crianças apresentava o nucleótido A, independentemente do grupo em estudo (Tabela XXIX).

Tabela XXIX – Distribuição do número absoluto de crianças consoante o grupo em estudo (alto risco, baixo risco, saudável) para a expressão do polimorfismo do gene ADAM 33.

ADAM 33 rs2280091; C__15969370_10; [A/G]TGGGGTGAACGCCGCCAGGGGGTG				
	Nucleótido A	Nucleótido G	Heterozigótigo	Total
Baixo risco	26	3	4	33
Alto risco	12	2	3	17
Saudáveis	21	9	0	30
Total	59	14	7	80

Da análise dos polimorfismo do gene GPRA verificou-se também que a grande maioria das crianças apresentava heterozigotia para os nucleótidos avaliados (Tabela XXX).

No entanto, para a avaliação isolada dos nucleótidos em estudo, tornou-se claro que as crianças saudáveis apresentavam essencialmente o nucleótido G e que as sibilantes apresentam o nucleótido C, com uma distribuição semelhante no que diz respeito ao grupo de alto risco e ao grupo de baixo risco de asma, referente à dimensão de cada subpopulação em estudo (Tabela XXX).

Tabela XXX- Distribuição do número absoluto de crianças consoante o grupo em estudo (alto risco, baixo risco e saudáveis) para a expressão de dois polimorfismos distintos do gene GPRA.

GPRA				
rs324377; C__2594474_10; [A/C]AATCACTGCCTTCTGACTTCAACTT				
	Nucleótido A	Nucleótido C	Heterozigótico	Total
Baixo risco	9	6	18	33
Alto risco	4	1	12	17
Saudáveis	1	13	16	30
Total	14	20	46	80

GPRA				
rs323922; C__2959829_10; [C/G]TTTCTCAGGAGTCCCTGGGGGAGGT				
	Nucleótido C	Nucleótido G	Heterozigótico	Total
Baixo risco	9	7	17	33
Alto risco	4	3	10	17
Saudáveis	1	13	16	30
Total	14	23	43	80

4. DISCUSSÃO

4.1. Recrutamento da amostra em estudo

O recrutamento de crianças sibilantes para a participação neste estudo mostrou-se difícil uma vez que o protocolo de investigação era muito restrito e exigente no que concerne aos critérios de inclusão e exclusão e ainda pelas referidas contingências para a realização da prova funcional respiratória (ausência de sintomatologia respiratória durante 3 semanas).

A maioria dos pais das crianças com patologia respiratória aceitou a participação no estudo, ainda que uma grande parte tenha desistido durante o mesmo, devido a cancelamentos das provas de função respiratória. De facto, algumas crianças tiveram de ser remarcadas 3 a 4 vezes por intercorrências respiratórias, uma vez que se pretendeu a avaliação funcional basal e não em agravamento, o que acarretou um adiamento de semanas desde a data inicial programada. As exacerbações clínicas e os adiamentos do exame, com vindas sucessivas e infrutíferas ao Serviço de Imunoalergologia, bem como a necessidade de manter as crianças sem qualquer terapêutica anti-inflamatória inalada ou oral, de carácter diário e preventivo, justificaram o número de desistências na participação no presente projecto, ou em alguns casos a impossibilidade da sua inclusão por ter sido ultrapassada a faixa etária em estudo ou em caso de hospitalização.

Neste sentido pode especular-se que as crianças mais graves foram excluídas do estudo, o que poderia afectar a magnitude de diferenças na avaliação dos parâmetros funcionais respiratórios e imunológicos.

As crianças cujos pais recusaram a participação neste estudo não diferiam daquelas cujos pais aceitaram participar, em relação a história parental de asma, sexo, gravidade do número de episódios de sibilância recorrente, tabagismo parental, pelo que se conclui não se poder tratar de um desvio do estudo.

Por outro lado, os pais das crianças saudáveis, recusaram na sua maioria a participação na investigação, o que se encontra de acordo com outros estudos internacionais.^{27,490,491}

Estes manifestaram receios inerentes à sedação com hidrato de cloral, ainda que não se trate de um anestésico e tenham sido elucidados os procedimentos e a rara possibilidade de ocorrência de efeitos adversos ou secundários, o que se encontra também em

concordância com outros estudos.⁶¹⁹ Curiosamente ainda que por vezes tenham sido expressas preocupações pela utilização de hidrato de cloral, pelos pais das crianças sibilantes, estas foram muitas mais fáceis de ultrapassar do que nos saudáveis, pela evidente explicitação da eventual comprovação objectiva da existência de anormalidades na prova de função respiratória, ainda que claramente informados da controvérsia aplicabilidade individual destes exames.

Os factos referidos anteriormente bem como a exigência no protocolo de investigação da ausência de qualquer intercorrência respiratória anterior, tornou o recrutamento dos controlos saudáveis uma tarefa muito difícil.

Pelas dificuldades inerentes ao recrutamento do grupo controlo, foram incluídas crianças pertencentes a estudo epidemiológico prospectivo, seguidas no *Great Ormond Street Hospital for Sick Children*, cumprindo os mesmos critérios de inclusão e exclusão, equipamento e protocolo de aquisição, colheita e registo de dados de função respiratória.

Refira-se que os pais de algumas crianças saudáveis não acederam à realização de prova de função respiratória sob sedação com hidrato de cloral mas consentiram a colheita de sangue para estudo imunológico e genético, uma vez que sendo referenciadas de serviços cirúrgicos, a colheita foi efectuada no decurso da avaliação analítica usual prévia a cirurgia programada.

Realce-se que este estudo é inovador em Portugal e tem como aspectos únicos o facto de estudar crianças dos 8 aos 20 meses de idade, com sibilância recorrente, que surgem com grande frequência na prática clínica, mas que não foram submetidas a qualquer terapêutica anti-inflamatória prévia, de carácter preventivo diário.

Este estudo permitiu ainda a implementação de uma nova técnica no Hospital de Dona Estefânia e o estabelecimento de um protocolo de investigação com o *Great Ormond Street Hospital for Sick Children*, em Londres. Sendo o único centro do país a utilizar esta técnica, recebeu o apoio e certificação de investigadores provenientes do *Portex Department of Anaesthesia Intensive Therapy and Respiratory Medicine*, do hospital britânico, tendo ocorrido várias visitas por parte destes ao laboratório nacional, garantindo uma standardização dos métodos utilizados, bem como a utilização dos mesmos processos de colheita de dados e análise.

4.2. Provas de Função Respiratória

As crianças com sibilância recorrente tinham idade ligeiramente superior na altura da prova funcional respiratória comparativamente às crianças saudáveis, explicitando-se este facto pela necessidade de permanecerem assintomáticas durante 3 semanas, bem como de apresentarem história clínica de pelo menos 3 episódios de sibilância diagnosticados por médico. Após ajuste para a idade e sexo, as crianças sibilantes eram significativamente mais pesadas, mas sem diferenças no comprimento, em relação ao grupo controlo. A razão pela qual se verificou esta diferença é pouco clara, no entanto, estas diferenças foram tidas em consideração no estudo de regressão múltipla do efeito da sibilância na função respiratória após apresentação dos resultados em Z-scores (ajustados para idade e dados antropométricos).

Turner e colaboradores reportaram a existência de uma associação negativa entre o ganho ponderal pós-natal e as modificações no $V'_{\max\text{FRC}}$ ajustado ao comprimento em lactentes entre 1 e 12 meses de idade. Especularam que nas crianças nascidas com baixo peso ocorreria posteriormente um período acelerado de crescimento durante a infância, em que o crescimento somático superaria o crescimento das vias aéreas e do pulmão, conduzindo a uma reduzida função pulmonar.⁶²⁰

Apesar de no presente estudo o baixo peso ao nascer constituir um factor de exclusão, talvez se possa verificar um fenómeno semelhante nas crianças que apresentam um ganho ponderal particularmente rápido. No entanto, não se observou nenhuma relação significativa entre o ganho de peso e deterioração da função respiratória.

Pela avaliação dos parâmetros obtidos, verificou-se que as crianças com sibilância recorrente eram mais pesadas e tinham valores de Z-scores para FVC, FEV_{0.5} e de débitos (FEF₇₅; FEF₂₅₋₇₅) inferiores às saudáveis, com diferenças estatisticamente significativas nestas avaliações, traduzindo uma menor função respiratória nas primeiras.

No entanto, não havia diferenças entre os dois grupos no débito máximo à capacidade residual funcional ($V'_{\max\text{FRC}}$) nem nos parâmetros obtidos em volume corrente: frequência respiratória, volume corrente ajustado ao peso (V_t/Kg) e razão entre o tempo para atingir o *peak expiratory flow* e o tempo expiratório [t_{PTEF}/t_E].

Tem sido evidenciado por alguns estudos que a alteração t_{PTEF}/t_E pode estar associada a sibilância posterior e eventualmente a asma.^{498,621} No entanto, esta associação tem sido limitada a grandes estudos epidemiológicos em que a avaliação funcional respiratória foi efectuada imediatamente após o nascimento, quando a modulação dos débitos expiratórios bem como do tempo expiratório é mais pronunciada, e ainda pela grande variabilidade destas medições, sendo discutíveis as conclusões obtidas.

A ausência de diferenças estatisticamente significativas na avaliação funcional respiratória em volume corrente, no presente estudo, encontra-se em concordância com o estudo efectuado por Dezateux e colaboradores na avaliação de crianças após a ocorrência de episódios de sibilância.²⁶

Apesar de estudos prévios terem documentado a existência de alterações na função respiratória em crianças dos 6 aos 12 meses previamente à ocorrência de episódios de dificuldade respiratória^{549,622} bem como em crianças com história prévia de sibilância,^{479,549} através da utilização da técnica de compressão torácica em volume corrente, vários estudos têm demonstrado que a técnica de compressão torácica em volume aumentado é mais sensível que a anterior.⁵⁶⁰⁻⁵⁶⁴ Esta pode ser a explicação para neste estudo não se terem verificado diferenças entre o grupo de crianças sibilantes e o grupo de crianças saudáveis nos valores obtidos pela técnica de compressão torácica em volume corrente.

Utilizando a técnica de compressão torácica em volume aumentado foi possível demonstrar que as crianças saudáveis apresentavam um Z-scores para FVC superior às crianças sibilantes. Este facto pode ser atribuído à existência de obstrução das vias aéreas nestas últimas, impedindo a expulsão do ar durante as manobras expiratórias forçadas.

Quando comparámos o subgrupo de crianças sibilantes com alto risco para asma utilizando o índice preditivo publicado por Castro-Rodriguez e colaboradores⁴⁴ com o grupo controlo, este último grupo apresentou valores de Z-scores significativamente superiores para volumes (FVC, FEV_{0.5}) e débitos (FEF₇₅ FEF₂₅₋₇₅ e V_{1maxFRC}), o que evidencia a existência de uma diminuição da função respiratória nas primeiras.

Comparando o subgrupo de crianças sibilantes com baixo risco para asma com o grupo de crianças saudáveis, as primeiras tinham idade significativamente superior às

saudáveis na ocasião do teste, o que não se verificou no grupo de alto risco para asma. Esta constatação deve-se ao facto da maioria destas crianças apresentarem episódios de dificuldade respiratória em contexto infeccioso, sendo estas as crianças que na sua maioria viram os exames serem remarcados, pelo que seriam mais velhas aquando do seu estudo. Estas crianças constituíram a maioria do grupo sibilante (alto risco e baixo risco), o que explica a existência de diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo saudável.

Em relação aos parâmetros funcionais respiratórios o grupo de baixo risco de asma apresentava valores de Z-scores significativamente mais baixos que o grupo de crianças saudáveis para FEV_{0,5} e débitos (FEF₇₅ FEF₂₅₋₇₅). No entanto, e em contraste com a comparação entre o grupo de alto risco e controlo, não havia diferenças na FVC nem no V_{maxFRC}. Poderemos argumentar que as crianças de baixo risco teriam uma diminuição da função respiratória mais ligeira do que as crianças de alto risco, caracterizando-se estas últimas por uma alteração funcional respiratória com comprometimento das pequenas vias aéreas, pelo que a técnica de compressão torácica em volume corrente não teria sensibilidade para detectar estas diferenças entre os grupos.

A compressão torácica em volume corrente apenas permitiu diferenciar o grupo de alto risco do grupo controlo, não existindo diferenças significativas na comparação entre sibilantes e saudáveis nem entre o grupo de baixo risco e saudáveis. Uma vez que o grupo de baixo risco tinha um maior número de indivíduos, pode constituir a explicação para não ter sido possível encontrar diferenças entre os sibilantes e os saudáveis.

As crianças com sibilância recorrente eram mais pesadas na altura do teste que as saudáveis, sendo possível especular se este facto pode ter condicionado os baixos valores de função respiratória obtidos. No entanto, convém reforçar que apesar deste facto se manter na análise dos diferentes subgrupos (alto risco e baixo risco) em comparação com os saudáveis, apenas existiam diferenças no V_{maxFRC} na comparação entre alto risco-saudáveis.

Por último, comparando as crianças de alto risco com as crianças de baixo risco, só existiam diferenças significativas na função respiratória na avaliação dos débitos médios (FEF₂₅₋₇₅ Z-scores) e da capacidade vital forçada (FVC Z-scores), apresentando as crianças de alto risco valores muito inferiores aos das crianças de baixo risco.

A redução da FVC nas crianças sibilantes, e particularmente no grupo de alto risco, acompanhada da redução dos débitos, reflecte provavelmente a existência de obstrução das pequenas vias aéreas com encerramento das vias aéreas a baixos volumes durante as manobras de expiração forçada, e não uma alteração do crescimento pulmonar.

Deve enfatizar-se que as crianças com alto risco tinham uma obstrução brônquica que condicionava obstrução da expiração forçada completa, com diminuição da FVC, pelo que as diferenças neste parâmetro só poderiam ser observadas na comparação entre alto risco-baixo risco e alto risco-controlo e não entre baixo risco-saudáveis.

Refira-se que a ocorrência de distensão gástrica decorrente das manobras de insuflação na técnica RVRTC foram excluídas pela ausência de redução da FVC entre a primeira e últimas manobras, tendo também sido excluídas todas as curvas com redução abrupta da FVC, o que poderia traduzir-se numa redução dos débitos.

Quanto ao facto dos débitos médios (FEF_{25-75} Z-scores) se encontrarem significativamente mais baixos no grupo de alto risco em comparação com o baixo risco, pode ser argumentado que as crianças com alto risco de asma tinham predominantemente obstrução das vias aéreas periféricas.

Neste estudo, os parâmetros de função respiratória nas crianças com sibilância recorrente com baixo risco de asma apontam para a existência de uma redução dos parâmetros de função respiratória, apesar de não serem tão baixos como os do grupo de alto risco.

Este grupo parece apresentar um padrão intermédio entre o padrão de obstrução (subgrupo de alto risco) e o padrão dos controlos saudáveis. Tal como enunciado anteriormente, só na avaliação dos débitos médios (FEF_{25-75} Z-scores) se verificaram diferenças na comparação entre todos os grupos em estudo.

Pelo exposto, também neste estudo a técnica de compressão torácica em volume aumentado (RVRTC) parece ser mais sensível que a técnica de compressão torácica em volume corrente (RTC) para diferenciar o grupo de crianças sibilantes do grupo controlo, bem como para distinguir entre os dois subgrupos de crianças sibilantes.

Apesar de vários estudos prospectivos terem demonstrado que as medições em volume corrente (frequência respiratória, volume corrente ajustado ao peso V_t/Kg e razão entre

o tempo para atingir o *peak expiratory flow* e o tempo expiratório t_{PTEF/t_E} podem estar relacionadas com o aparecimento de asma mais tarde na vida,^{474,621} no presente estudo não foi possível documentar quaisquer diferenças nestes parâmetros na análise dos grupos em estudo.

A avaliação global dos dados obtidos permite-nos inferir que as crianças com sibilância recorrente têm pior função respiratória que os controlos saudáveis e que entre os sibilantes, as crianças categorizadas como alto risco têm uma obstrução das vias aéreas com comprometimento essencialmente das pequenas vias aéreas periféricas.

Comparando os dados obtidos com os resultados de outros estudos internacionais publicados, os estudos de coorte desde o nascimento reportaram uma associação entre baixos valores de V'_{maxFRC} nos primeiros meses de vida em crianças sem qualquer sintomatologia respiratória prévia, e o risco acrescido de sibilância nos primeiros anos de vida.^{9,27,34,479-482} No entanto existem relatos contraditórios quanto à sua possível associação com a ocorrência de asma mais tarde na vida.^{7,457,477,555}

Todos estes estudos são epidemiológicos e não avaliaram as crianças após vários episódios de sibilância recorrente, o que é na verdade, a realidade clínica. Por outro lado em termos metodológicos só utilizaram a técnica de compressão rápida torácica em volume corrente (RTC).

Tal como referido previamente, a técnica de compressão torácica em volume aumentado (RVRTC) tem maior sensibilidade que a técnica de compressão torácica em volume corrente (RTC) na distinção de diferenças na função respiratória, particularmente periférica e das pequenas vias aéreas, em crianças com doença pulmonar,^{561-564,566} bem como na avaliação da resposta a broncodilatador.^{566,623-625} Esta evidência encontra-se de acordo com os dados obtidos no presente estudo, só sendo possível diferenciar os grupos de baixo risco dos saudáveis e alto risco dos de baixo risco, através da utilização desta técnica.

Os estudos que tinham por objectivo avaliar crianças com sibilância recorrente através da utilização da técnica RVRTC apenas tentaram provar a sua reprodutibilidade e utilidade na avaliação da obstrução das vias aéreas quando comparada com outros parâmetros clínicos, laboratoriais ou de função respiratória, mas não tinham grupo de controlo.^{561,564,566}

Se por um lado, uma das limitações deste estudo pode residir no baixo número de indivíduos em estudo, por outro lado surge como uma grande vantagem a comparação de crianças com sibilância recorrente sem terapêutica anti inflamatória com um grupo saudável e em que factores sobejamente reconhecidos como tendo um impacto negativo no subsequente desenvolvimento pulmonar, tais como a prematuridade⁶²⁶ e o atraso de crescimento intra-uterino,⁶²⁷ foram também eliminados como possível desvio deste estudo.

O protocolo inicial incluía a medição da FRC, para além das medições em volume corrente e compressão torácica (em volume corrente e volume aumentado). No entanto, este protocolo revelou-se muito moroso, tendo algumas crianças acordado no decurso do mesmo. Uma vez que as medições com a técnica de compressão torácica constituíam o objectivo primordial do estudo, foi retirada a medição da FRC, pelo que não foi possível comprovar a eventual insuflação nas crianças de alto risco.

Apesar de não terem sido efectuadas medições da FRC, mesmo que estas estivessem alteradas, os valores de V'_{maxFRC} teriam sido obtidos em volumes mais elevados nas crianças sibilantes em relação ao grupo controlo, minimizando assim as diferenças obtidas entre estes grupos.⁵⁶⁰

Este facto, associado à variabilidade intrínseca do EEL na infância poderá também explicar a menor sensibilidade da técnica RTC em relação a RVRTC na distinção entre os grupos no presente estudo.

Em termos sumários e após ajustamento para o sexo, idade, comprimento e tabagismo materno durante a gravidez, os débitos expiratórios e volumes na técnica de compressão torácica em volume aumentado, mas não o V'_{maxFRC} nem nenhum dos parâmetros em volume corrente, encontravam-se significativamente reduzidos durante os primeiros 2 anos de vida em crianças com sibilância recorrente, quando comparados com um grupo controlo. Entre as crianças com sibilância recorrente, as de alto risco de asma apresentavam valores significativamente inferiores para FVC e FEF₂₅₋₇₅ em relação às de baixo risco.

Contrariamente ao referido por outros autores,^{7,26} no presente estudo, avaliando toda a população em estudo, não foi encontrado qualquer efeito da exposição tabágica na gravidez na avaliação funcional respiratória, o que pode ser explicado pelo reduzido

número de crianças em estudo em cada subgrupo, a população estudada ser muito seleccionada, ou alguma possível associação entre sibilância e tabagismo materno, uma vez que na avaliação compartimentada apenas das crianças sibilantes, os débitos eram significativamente mais baixos em filhos de mães fumadoras.

Este estudo tem como aspectos únicos o facto de estudar crianças com sibilância recorrente sem qualquer terapêutica anti-inflamatória prévia, em comparação com o grupo controlo, utilizando uma técnica de elevada sensibilidade, e tentando correlacionar os valores de função respiratória obtidos com outros parâmetros clínicos.

Em relação ao grupo de crianças saudáveis, trata-se de um grupo muito seleccionado uma vez que todas as crianças com história de intercorrências respiratórias prévias ou história parental de asma brônquica foram excluídas. Alguns autores associaram a história materna de asma por si só a uma diminuição dos parâmetros de função respiratória,^{27,479} ainda que Murray e colaboradores não tenham obtido resultados similares.⁴⁸⁰

4.3. Avaliação Laboratorial

Não se documentaram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as crianças em estudo (sibilantes de alto risco de asma, sibilantes de baixo risco de asma e saudáveis) no que diz respeito à distribuição por sexo, idade gestacional e exposição ao fumo do tabaco, pelo que se infere que nenhum destes factores poderia constituir um desvio do estudo.

Refira-se que se encontrou concordância entre o doseamento da cotinina urinária nas crianças em estudo sobre a resposta afirmativa de tabagismo activo das suas mães, o que está de acordo com o descrito por alguns autores.⁶⁰³

No presente estudo, contrariamente ao que se reporta na literatura internacional não foram encontradas diferenças na avaliação da IgE total sérica, não sendo possível inferir ilações quanto à sensibilização específica a alergénios ambientais uma vez que a quase totalidade das crianças não se encontrava sensibilizada a nenhum alergénio. Este facto justifica-se pela faixa etária dos doentes em estudo ser muito jovem uma vez que a sensibilização a aeroalergénios usualmente surge mais tarde.

Refira-se que no estudo prospectivo de Morais-Almeida e colaboradores englobando 308 crianças com sibilância recorrente, a IgE total sérica também não foi identificada como um factor de risco independente para a persistência dos sintomas em idade escolar.⁶

4.3.1. Citometria de Fluxo

Da avaliação de populações celulares por citometria de fluxo foi possível concluir que as crianças com sibilância recorrente não apresentavam diferenças em relação às crianças saudáveis na avaliação percentual das populações $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^{forte}$, $CD4^+CD25^+GITR^+$ e $CD4^+CD25^{forte}Foxp3^+$, verificando-se na sua quantificação absoluta somente diferenças na população $CD4^+CD25^{forte}$, com valores significativamente inferiores no grupo de crianças sibilantes. Registe-se ainda que as crianças saudáveis apresentavam valores percentuais e absolutos da população $CD4^+CD25^+CTLA-4$ significativamente superiores às crianças sibilantes.

A população de células $CD4^+CD25^+$ tem sido investigada em vários estudos, documentando-se o seu papel preponderante na regulação da resposta imunitária. Esta sub-população de linfócitos T $CD4^+$ expressa várias moléculas de superfície entre as quais se destaca CTLA-4^{212,220,221} e GITR.^{212,224-226} O aumento do número de células T reguladoras está associado ao aumento de expressão CTLA-4⁺, que se encontra envolvido na actividade reguladora, sendo o marcador que se reveste de maior importância na sua fase efectora, para a actividade supressora.^{228,229}

No presente estudo as crianças sibilantes apresentavam em menor quantidade células com expressão de CTLA-4, podendo ser postulado que esta deficiente expressão conduziria a uma menor actividade supressora/reguladora, podendo levar a uma perpetuação do processo inflamatório.

Por outro lado, tem sido documentado que a população $CD4^+CD25^{forte}$ será a que à partida primará pela sua actividade reguladora.^{233,234} Neste sentido será interessante verificar que as crianças sibilantes apresentavam um número absoluto destas células muito inferior às crianças saudáveis.

Realce-se o facto de a população alvo em estudo ter entre 8 e 20 meses de idade, com as inerentes peculiaridades na colheita de grandes volumes de sangue, tornando a quantificação de eventos raros por citometria de fluxo particularmente difícil.

O facto de serem encontradas diferenças na quantificação em número absoluto, e não em valores percentuais, da população de células $CD4^+CD25^{forte}$ poderá abrir uma nova janela na investigação de células reguladoras. Este facto encontra-se de acordo com as diferenças encontradas na avaliação do número total de linfócitos.

Poderá especular-se que, à semelhança do que se encontra descrito na literatura para a avaliação da memória imunológica utilizando tetrâmeros, que identificam células também consideradas eventos raros, será importante a avaliação sistemática do número absoluto destas populações celulares em lactentes e crianças mais novas em detrimento da sua avaliação percentual, pelas limitações já referidas.

Assim sendo, pode-se perspectivar a possibilidade das crianças sibilantes apresentarem efectivamente valores absolutos de células com actividade predominantemente reguladora ($CD4^+CD25^{forte}$) inferiores às crianças saudáveis bem como uma menor quantidade de células com expressão de um marcador de superfície de suma importância para a actividade supressora ($CD4^+CD25^+CTLA-4^+$). Estas diferenças condicionam uma maior susceptibilidade para a tradução clínica da sibilância recorrente e perpetuação do processo inflamatório.

Quando comparámos o subgrupo de crianças sibilantes com alto risco para asma com o grupo controlo, verificou-se que as primeiras apresentavam valores médios para o número absoluto de $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{forte}$ significativamente mais baixos que as crianças saudáveis, não se observando diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros obtidos em valores percentuais das mesmas populações, podendo uma vez mais reforçar-se a hipótese da necessidade da avaliação sistemática do número absoluto destas populações celulares.

Verificaram-se ainda valores significativamente superiores, nos valores percentuais e absolutos da população $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ nas crianças saudáveis em relação às crianças de alto risco, reforçando a ideia de que a expressão de moléculas de actividade supressora se encontra diminuída nas crianças sibilantes com alto risco para asma brônquica.

Destaque-se que estas diferenças também se verificaram na comparação entre o grupo de crianças com alto risco e o grupo de crianças com baixo risco, apresentando as primeiras valores significativamente inferiores no número absoluto de $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{forte}$. No entanto não se documentaram diferenças significativas entre estas na avaliação da população $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$, o que poderá significar que em ambos os grupos existe uma expressão de moléculas supressoras, embora não totalmente eficaz.

Esta possibilidade encontra-se suportada pelo facto de na avaliação entre crianças de baixo risco de asma e o grupo de crianças saudáveis apenas se encontrarem diferenças precisamente na população $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$, não havendo diferenças nas populações com actividade reguladora. Deste modo, nas crianças saudáveis existe uma resposta imunológica eficaz traduzida pela expressão de moléculas supressoras.

De facto, as crianças com baixo risco de asma e as crianças saudáveis têm valores percentuais e absolutos de $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{forte}$ semelhantes, não existindo diferenças nas populações reguladoras mas sim na expressão de moléculas supressoras.

Em sùmula, as crianças de alto risco para asma apresentavam uma diminuição significativa do número absoluto das populações celulares ($CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{forte}$) com actividade reguladora, em relação aos grupos de baixo risco para asma e ao grupo controlo. Destaca-se ainda a redução percentual e absoluta da população que expressa CTLA-4, cuja expressão se reconhece fundamental para a actividade supressora,^{228,229} no grupo de alto risco em relação ao grupo controlo.

Estes resultados encontram-se em concordância com o estudo de Haddeland e colaboradores, que documentaram uma reduzida capacidade de produção de células reguladoras num grupo de recém-nascidos com história familiar de alergias em comparação com um grupo controlo.²⁸¹

No entanto, não existem na literatura estudos que visem a abordagem da criança com sibilância recorrente para o estudo destas populações celulares em sangue periférico, o

que por um lado confere a este estudo uma maior importância pela sua inovação, mas impede a sua comparação com estudos semelhantes.

De facto, encontram-se apenas estudos que visaram a avaliação destas populações celulares em crianças com alergia alimentar,^{270,273} em crianças saudáveis com história familiar de alergias²⁸¹ e em crianças asmáticas. Nestas últimas, tem sido documentado por vários autores a inexistência de diferenças estatisticamente significativas na quantificação percentual de populações celulares CD4⁺CD25⁺²⁸⁰ ou CD4⁺CD25^{forte}^{244,282} entre crianças asmáticas e grupo controlo, o que estaria de acordo com os resultados encontrados no presente estudo.

Como referido anteriormente, trata-se de um estudo de eventos considerados raros, com as respectivas limitações dada a população em estudo, devendo, face aos resultados obtidos, colocar-se a possibilidade da recomendação da avaliação do número absoluto destas populações celulares em lactentes e crianças mais novas em detrimento da sua avaliação percentual, porquanto nestas últimas poderá tornar-se inviável o achado de diferenças em relação a um grupo controlo.

Curiosamente, no presente estudo, não se verificaram quaisquer diferenças na avaliação percentual e quantitativa da expressão de Foxp3 entre os grupos de crianças sibilantes nem na comparação entre estas e as crianças saudáveis. A expressão deste marcador intracelular tem vindo a ser considerado por alguns autores como um marcador específico das células reguladoras,^{237,239,240} essencial para a sua actividade,^{149,237} embora recentemente se postule que também este possa existir em populações de células activadas.²⁴⁶

De qualquer modo seria de esperar que as diferenças encontradas na avaliação do número absoluto de células CD4⁺CD25^{forte} se encontrassem também na expressão de Foxp3, uma vez que segundo a literatura a maioria destas células expressam este marcador,^{241,242} o que poderia destrinchá-las de células activadas.²³⁵

Uma possível explicação para este achado poderá residir no facto da expressão de Foxp3 poder eventualmente ocorrer de forma intermitente, sendo fundamental para a maturação das células reguladoras mas podendo a sua expressão ser indutível,²⁴⁶ por alguns períodos, por exemplo pela acção de corticosteróides,²⁸⁹ sendo mesmo possível

que a indução da sua expressão possa determinar que células possam adquirir um fenótipo regulador.²⁴⁷

Por outro lado, existem estudos que documentam a diminuição da expressão de mARN para Foxp3 em culturas celulares estimuladas com extractos de ácaros em doentes asmáticos em relação ao grupo controlo apesar de não existirem diferenças na quantificação em sangue periférico de células CD4⁺CD25^{forte}.²⁴⁴

4.3.2 Expressão de mARN para CTLA-4, Foxp3 e citocinas

Pela avaliação da expressão de mARN foi possível inferir que após estimulação específica com extractos de ácaros do pó doméstico, as crianças sibilantes apresentavam uma inibição da expressão de CTLA-4 ao passo que as crianças saudáveis expressavam CTLA-4, sendo esta diferença de expressão estatisticamente significativa. Pela avaliação das crianças sibilantes em relação ao risco de asma, verificou-se que as de alto risco de asma apresentavam uma inibição de expressão de CTLA-4, enquanto as crianças de baixo risco de asma e as crianças saudáveis apresentavam expressão de CTLA-4, sendo esta diferença estatisticamente significativa na comparação das crianças de alto risco com as saudáveis.

Estes resultados corroboram os encontrados na avaliação das populações celulares por citometria de fluxo, podendo mais uma vez especular-se que nas crianças de alto risco existe uma diminuição de populações celulares com função supressora, sendo reconhecido o papel do CTLA-4 como molécula major de supressão.^{228,229}

O presente estudo é também corroborado por Haddeland e colaboradores, que estudaram o sangue do cordão de um grupo de recém-nascidos com história familiar de alergias em comparação com grupo controlo documentando o aumento da expressão de CTLA-4 por citometria de fluxo nas células de cordão estimuladas com β -lactoglobulina nas saudáveis.²⁸¹

Saliente-se porém que esta expressão era essencialmente pronunciada nas células CD4⁺CD25^{forte},²⁸¹ encontrando-se também descrito que a expressão de CTLA-4 é potenciada pela estimulação com PHA nas células CD4⁺CD25⁺ e não nas CD25⁻.²¹⁹

Num estudo efectuado por Hellings e colaboradores, o bloqueio da expressão de CTLA-4 em ratinhos geneticamente predispostos para alergia potenciou a sensibilização alérgica e a inflamação eosinofílica alérgica das vias aéreas.⁶²⁸

Não se registaram diferenças para a expressão de mRNA para Foxp3, defendido por alguns autores como marcador específico das células reguladoras,^{149,237,239,240} à semelhança dos resultados encontrados na avaliação por citometria de fluxo.

Estes resultados encontram-se de acordo com um estudo que não documentou diferenças na expressão de Foxp3 em culturas de células do cordão com extractos de ácaros do pó doméstico entre filhos de mães atópicas e não atópicas.²⁹⁰

Refira-se que a conceptualização do Foxp3 como marcador específico das populações de células reguladoras permanece muito discutível porquanto este marcador surge nas células activadas.²⁴⁶

Existem na literatura internacional estudos que demonstram a menor expressão de mRNA para as moléculas Foxp3, em culturas celulares com alérgenos em indivíduos com asma e em crianças com alto risco de asma e até mesmo aumento da sua expressão em agudizações da doença ou após terapêutica com corticosteróides.^{282,284-289}

A expressão de CTLA-4 e de Foxp-3 em cultura de células com PMA encontrava-se diminuída nas crianças sibilantes em comparação com as crianças saudáveis, embora sempre revelando alguma expressão, demonstrando a existência de proliferação celular. Refira-se no entanto que não foi possível inferir diferenças significativas quanto à sua expressão na comparação entre os grupos de crianças de alto e baixo risco para asma e o grupo de crianças saudáveis.

Estes resultados encontram-se de acordo com os publicados por Schaub e colaboradores²⁹⁰ em que as células de cordão de crianças filhas de mães atópicas estimuladas com peptidoglicano, não apresentavam diferenças significativas para a expressão de mRNA para Foxp3 nem para CTLA-4, em relação às crianças filhas de mães não atópicas. Do mesmo modo e à semelhança deste estudo, também documentaram uma tendência para menor expressão de Foxp3 nas crianças de alto risco (filhas de mães atópicas), embora sem significado estatístico.²⁹⁰

Pela avaliação da expressão de mRNA para citocinas, não se encontraram diferenças na expressão de citocinas de papel regulador tal como a IL-10 e TGF- β , nas culturas com PMA, nem nas culturas com extractos de ácaros, o que se encontra uma vez mais de acordo com os resultados obtidos no estudo de Schaub e colaboradores²⁹⁰.

Yang e colaboradores não documentaram diferenças na expressão de mRNA para IL-10 em células do cordão umbilical de recém-nascidos estimuladas com mitogénios, em crianças com alto risco e crianças de baixo risco para doenças atópicas, definido pela história familiar.⁶²⁹

Neste sentido, também será interessante verificar que num estudo efectuado por Koning e colaboradores não foram encontradas diferenças na expressão de mRNA para IL-10 em células mononucleares de sangue periférico entre crianças asmáticas e o grupo controlo.⁶³⁰

Existem estudos que documentam menor expressão de mRNA para IL-10 em indivíduos asmáticos,^{266,267} postulando-se que nas doenças alérgicas pode existir um desequilíbrio entre as células T reguladoras produtoras de IL-10 e as células Th₂.²⁷¹

A ausência de diferenças estatisticamente significativas na expressão de Foxp3 e também na expressão de TGF- β , particularmente nas culturas com extractos de ácaros, encontra-se em consonância com a literatura internacional uma vez que a presença de TGF- β constitui um elemento chave para a expressão de Foxp3.²⁴³

No presente estudo a ausência de diferenças nesta expressão pode reforçar a inexistência de diferenças na expressão de Foxp3, bem como na avaliação por citometria das populações de células reguladoras, entre as crianças com alto e baixo risco para asma brônquica. Deve salientar-se que estas conclusões estão em consonância com outros estudos na literatura já referidos, quer na avaliação por citometria de fluxo, quer na expressão de mRNA.

Torna-se particularmente importante enfatizar que a expressão de mRNA para IFN- γ na cultura com extractos de ácaros com leitura ao 7º dia, se encontrava significativamente diminuída nos sibilantes em relação ao grupo controlo. Por outro lado, também se verificou uma diminuição da sua expressão, estatisticamente significativa nas crianças de alto risco em relação ao grupo controlo, bem como em relação às crianças com baixo risco de asma, sendo mesmo o único parâmetro quanto à expressão de mRNA que

permitiu destringir as crianças de alto e baixo risco de asma. A inibição da expressão para esta citocina só se verificou uma vez mais para a cultura com extractos de ácaros e não para a cultura com PMA, em que apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas, se verificou a existência da sua expressão, decorrente da proliferação celular.

É reconhecido que ocorre produção de IFN- γ pelas células Th₁, sendo esta citocina um potente inibidor da resposta Th₂. Por outro lado é também sabido desde há alguns anos que em asmáticos e doentes atópicos existe um perfil Th₂, com supressão da resposta Th₁. É actualmente aceite que células de cordão umbilical estimuladas apresentam um perfil Th₂ e diminuição do padrão Th₁, condicionando o risco de desenvolvimento posterior na vida de uma doença atópica.⁶³¹⁻⁶³³

Vários estudos têm comprovado especificamente uma reduzida produção de IFN- γ em crianças que desenvolveram posteriormente doenças atópicas,⁶³⁴⁻⁶³⁶ havendo no entanto outros estudos em que esta possível associação não se verificou.⁶³⁷⁻⁶³⁹

Kondo e colaboradores, num estudo prospectivo de recém-nascidos até aos 6 anos de idade, comprovaram que as crianças com asma brônquica, dermatite atópica ou rinite aos 6 anos de idade tinham uma produção significativamente inferior de IFN- γ em células do cordão estimuladas com alergénio (ovalbumina, albumina bovina sérica).⁶³⁵

No estudo de Tucson, efectuado por Martinez e colaboradores, a reduzida produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico estimuladas, após o nascimento e aos 3 meses de vida, estaria associada a um risco elevado de sibilância recorrente no primeiro ano de vida.⁶⁴⁰

Por outro lado, vários estudos comprovaram uma reduzida produção de IFN- γ em células do cordão ou células mononucleares em sangue periférico estimuladas com alergénio, nas crianças com alto risco de doenças alérgicas definido pela história familiar em relação às crianças de baixo risco,^{641,642} não sendo no entanto esta associação consensual, uma vez que não foi comprovada noutros estudos uma menor expressão mARN para IFN- γ .^{629,643}

No estudo de coorte de recém-nascidos efectuado por van der Velden e colaboradores, foi documentada a existência de uma produção aumentada de citocinas de perfil Th₂ em

células estimuladas com alergénio, ao nascimento, aos 6 e 12 meses de idade, em crianças de alto risco para doenças atópicas, sendo explicitado pelos autores que este desvio se deveu à menor produção de IFN- γ , no período neonatal.⁶⁴²

Refira-se que à semelhança do presente estudo também van der Velden e colaboradores não documentaram diferenças com estimulação inespecífica mas somente após estimulação alérgica, o que pode indiciar um defeito regulador.⁶⁴²

Segundo alguns autores, a ocorrência por si só de infecções de etiologia viral, pode condicionar uma diminuição da produção de IFN- γ . De facto, Joshi e colaboradores, num estudo de corte de recém-nascidos, documentaram uma diminuição da produção de IFN- γ nas secreções nasais das crianças com episódios de infecções respiratórias altas com e sem sibilância associada, em relação ao grupo controlo, que era independente da atopia.⁶⁴⁴

Por outro lado, encontra-se esclarecido o eventual papel dos vírus respiratórios como potentes estímulos da resposta Th₂, existindo diversos estudos que documentam o desvio da resposta imunológica neste sentido após episódios de bronquiolite de etiologia viral, particularmente a vírus sincicial respiratório.⁶⁴⁵⁻⁶⁴⁹

Curiosamente, num estudo efectuado por Renzi e colaboradores, foi avaliada a função respiratória por intermédio da técnica de compressão rápida torácica ($V'_{\max FRC}$) e o perfil citocínico em lactentes, cinco meses após internamento por bronquiolite aguda, com avaliação clínica posterior aos 2 anos de idade. Estes autores concluíram que a menor produção de IFN- γ constituía factor preditivo para menor $V'_{\max FRC}$ passados 5 meses, bem como factor preditivo para asma aos 2 anos de idade.⁶⁵⁰

Deste modo, no presente estudo, verificou-se uma marcada redução da produção de IFN- γ em células mononucleares periféricas estimuladas com extractos de ácaros do pó doméstico nas crianças sibilantes em comparação com as crianças saudáveis e dentro do primeiro grupo, uma marcada redução da expressão desta citocina nas crianças de alto risco de asma, o que pode ser suportado pelos estudos já enumerados. Por outro lado, estas diferenças poderão também vir de encontro aos resultados obtidos na avaliação funcional respiratória e constituir como exposto por alguns estudos um factor de risco para o desenvolvimento posterior de asma brônquica.

Saliente-se no entanto, que apesar das diferenças encontradas, os resultados obtidos apresentavam uma grande dispersão e uma sobreposição entre crianças pertencentes a diferentes grupos em estudo, pelo que a aplicabilidade individual destes doseamentos na tentativa de distinção entre crianças de alto e baixo risco de asma, torna-se controversa.

As mesmas considerações podem ser aplicadas aos resultados da avaliação funcional respiratória e da avaliação laboratorial por citometria de fluxo. De facto, no presente estudo, e à semelhança das variadas publicações neste domínio, foram comparados grupos de crianças, sendo a aplicabilidade individual controversa, devendo ser reforçada a importância do seguimento prospectivo de cada criança ao longo do tempo.

4.3.3 Estudo de polimorfismos

No presente estudo foram avaliados vários polimorfismos com possível associação à asma brônquica, tendo sido escolhidos três genes que têm vindo a comprovar uma forte associação com asma brônquica e hipersusceptibilidade brônquica: ADAM 33, GPRA e DPP10.³⁵³

Para o gene ADAM33 e de acordo com a publicação de Van Eerdewegh e colaboradores³³⁹ foram avaliados dois polimorfismos existentes em intrões (rs3918395 com variação do nucleótido adenina por citosina; rs597980 com variação do nucleótido adenina por guanina), polimorfismos que originaram alterações *missense* na proteína codificada (rs2280091 com alteração do aminoácido treonina por metionina; rs3918392 com alteração do aminoácido alanina por treonina; rs3918396 com alteração do aminoácido isoleucina por valina), um polimorfismo que origina uma alteração sinónimo (rs528557 com variação do nucleótido citosina por guanina) e um polimorfismo por alteração na região 3'UTR (rs2787094 com variação do nucleótido citosina por guanina). Não foi possível inferir diferenças estatisticamente significativas para a presença de qualquer dos polimorfismos referidos, quer entre as crianças sibilantes e as crianças saudáveis, quer entre os diferentes grupos de crianças sibilantes e as crianças saudáveis, com excepção do polimorfismo referenciado por rs2280091, com variação guanina.

Trata-se de um polimorfismo que ocorre por uma alteração *missense*, uma vez que origina uma variação de transcrição qualitativa com substituição de um aminoácido (treonina por metionina), localizando-se no exão 20.

É um polimorfismo de nucleótido único, que apresentou no estudo de Van Eerdewegh e colaboradores³³⁹, forte associação de *linkage* em desequilíbrio, significando que após a análise inicial feita por *linkage* no grupo em estudo com aproximação ao *locus*, revelou uma forte associação para asma e hipersusceptibilidade brônquica, através da análise dos casos-controlo, transmissão génica de desequilíbrio e análise dos haplotipos funcionais. Neste estudo, e uma vez que vários SNPs podem interagir de modo a aumentar o risco de asma, foram elaborados haplotipos, que revelaram significância dos resultados obtidos.

Refira-se que no estudo original de Van Eerdewegh e colaboradores³³⁹ o polimorfismo estudado referia uma associação à asma pela presença do nucleótido C (citosina), de acordo com a orientação 5'-3' do gene ADAM33. No entanto, os ensaios da *Applied Biosystems*, utilizados neste trabalho, baseiam as suas sondas na orientação da sequência do genoma humano, pela necessidade de uniformização pela “*NCBI reference genome*”, pelo que no presente estudo se documenta a presença do polimorfismo associado à asma com a presença do nucleótido G (guanina).

No presente estudo verificou-se que independentemente do grupo em estudo, a maioria era homocigótica para o nucleótido A (adenina), não sendo possível inferir mais conclusões pela avaliação da distribuição dos casos.

Tal como referido anteriormente, este é talvez o gene com mais estudos confirmados de associação à asma³⁷¹⁻³⁷⁶ e alteração da função respiratória na infância,^{372,374,375} encontrando-se descritos 17 SNPs diferentes com associação a asma brônquica.³⁷⁷

Refira-se que de acordo com a literatura internacional alguns estudos não documentaram qualquer associação deste gene com asma brônquica^{317,378,379} e até mesmo no estudo de Howard e colaboradores se comprovou que etnias americanas diferentes apresentavam diferentes SNPs para o gene ADAM33 não sendo possível identificar um comum a todas elas.³⁸⁰

O papel de *ADAM33* para a asma brônquica mantém-se controverso, envolvendo provavelmente uma combinação de SNPs, sendo imprescindível um estudo mais abrangente para que se possam inferir mais conclusões.

Para o gene GPRA foram estudados os polimorfismos descritos inicialmente por Laitinen e colaboradores³⁵⁹ como de associação à asma, que foram posteriormente reproduzidos por outros investigadores.

Deste modo, foi reportada a associação com asma e hipersusceptibilidade brônquica para o polimorfismo estudado por Kormann e colaboradores,³⁶⁰ codificado por um intrão (rs740347 com variação do nucleótido citosina por guanidina) e dois polimorfismos avaliados por Melen e colaboradores³⁶¹ sendo um codificado por um intrão (rs324377 com variação do nucleótido adenosina por citocina) e outro por alterações *missense* (rs323922 com alteração do aminoácido valina por isoleucina).

Saliente-se que os polimorfismos referidos anteriormente como de associação à asma e hipersusceptibilidade brônquica, estudados por Melen e colaboradores³⁶¹ não apresentaram qualquer associação à asma brônquica na população estudada por Kormann e colaboradores.³⁶⁰

No presente trabalho foram estudados os três polimorfismos do gene GPRA referidos, verificando-se uma associação para os polimorfismos estudados por Melen e colaboradores³⁶¹ para crianças com sibilância, em relação ao grupo das crianças saudáveis, não se verificando qualquer diferença entre estes dois grupos de crianças no que concerne ao polimorfismo reportado por Kormann e colaboradores.³⁶⁰ Refira-se que também Shin e colaboradores não encontraram qualquer associação de polimorfismos GPRA e asma.³⁶²

Foi possível inferir diferenças na expressão destes polimorfismos na avaliação entre crianças saudáveis e sibilantes, não se verificando no entanto uma expressão preferencial do mesmo nos subgrupos de crianças sibilantes.

Reforce-se uma vez mais que o presente estudo incidiu sobre crianças com sibilância recorrente, em que a existência de hipersusceptibilidade brônquica é uma característica comum, justificando a associação com polimorfismos descritos na literatura como associados a asma e hipersusceptibilidade brônquica.

No presente estudo foram também analisados dois polimorfismos do gene DPP10 que surgem por alterações *missense* (rs2053724 com alteração do aminoácido valina por isoleucina; rs36044503 com alteração do aminoácido metionina por valina) e um polimorfismo por alteração sinónimo (rs35766316 com variação do nucleótido citosina

por guanina) não se verificando diferenças estatisticamente significativas na avaliação das crianças em estudo.

Allen e colaboradores³⁵⁴ reportam uma associação de SNPs no gene *DPP10* e asma, não existindo no entanto outros estudos que o comprovem, pelo que estes resultados são pouco conclusivos, dada a falta de reprodutibilidade.

Deve salientar-se que os estudos de associação de genes candidatos são usualmente efectuados em grandes grupos populacionais, pelo que surge como uma limitação do presente estudo o número de crianças avaliadas, que condicionou seguramente a inexistência de associação na maioria dos polimorfismos estudados e lhe confere o carácter de estudo piloto que deverá ser continuado nos anos vindouros.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sibilância recorrente na criança é uma entidade muito frequente na prática clínica. Nos últimos anos a comunidade científica tem devotado bastante interesse no estudo de factores de risco para a asma brônquica, que podem tornar-se fundamentais na avaliação da criança com sibilância recorrente, a fim de permitir um diagnóstico precoce de asma e o adequado acompanhamento terapêutico.

No sentido de procurar a existência de marcadores quantificáveis que permitam distinguir as crianças sibilantes com risco acrescido de asma em relação às restantes, pretendeu-se, como objectivo primário deste projecto de investigação, estudar a função respiratória com a técnica recente de compressão torácica em volume aumentado (que mimetiza uma espirometria no adulto) e secundariamente efectuar uma avaliação imunológica (estudo de populações celulares por citometria de fluxo e estudo de expressão de citocinas em culturas celulares estimuladas com extractos de ácaros) e o estudo de polimorfismos de genes associados à asma.

Este estudo reveste-se de particular importância pelo seu carácter inédito em Portugal, tendo permitido a implementação destes exames funcionais respiratórios pela primeira vez no país e o reconhecimento da sua realização pelos pares europeus, com validação por investigadores provenientes de um centro de excelência nesta matéria na Europa.

Por outro lado, não existem estudos internacionais de função respiratória nesta faixa etária que tenham estudado crianças com sibilância recorrente, procurando estabelecer uma associação entre factores clínicos e função respiratória, em relação a um grupo controlo.

Embora existam várias publicações referentes a avaliações imunológicas, em crianças asmáticas e crianças com sibilância, os resultados não são consensuais, pelo que se pretendeu também o seu estudo e inferir eventuais associações tendo em conta factores de risco para asma.

Foram encontradas diferenças no grupo de crianças de alto risco em relação às de baixo risco, com valores significativamente inferiores nas primeiras, na avaliação da função respiratória, particularmente na avaliação de débitos, na quantificação absoluta de

populações celulares de carácter regulador ($CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{forte}$) avaliadas por citometria de fluxo e ainda na expressão de mRNA para IFN- γ em culturas celulares estimuladas com extractos de ácaros.

Embora a aplicabilidade individual destas avaliações seja controversa, poderá constituir um patamar de investigação futura neste domínio que possa comprovar a sua aplicabilidade clínica para a avaliação da criança com sibilância recorrente. Deste modo, a avaliação destes parâmetros fisiológicos em conjugação com outros dados clínicos poderá vir a ser útil para a intervenção diagnóstica e/ou terapêutica destas crianças.

As crianças que participaram neste estudo mantêm-se em seguimento prospectivo a fim de inferir o valor preditivo para asma em idade escolar destes resultados. Refira-se que em termos de avaliação funcional respiratória, a idade pré-escolar tem sido considerada internacionalmente como a “idade das trevas” pela dificuldade de cooperação das crianças e pela impraticabilidade de sedação, tendo nos últimos anos sido publicadas orientações para a utilização de diferentes critérios para a sua realização que permitem a sua exequibilidade. Neste sentido, encontra-se actualmente em curso um protocolo de investigação inovador, em cooperação com os investigadores do *Great Ormond Street Hospital for Sick Children*, que pretende aferir a prova de broncodilatação em idade pré-escolar. Permitirá também validar a realização destas provas na população portuguesa nesta faixa etária, possibilitando o seguimento prospectivo da avaliação funcional respiratória das crianças deste estudo até à idade escolar.

Referências Bibliográficas

- 1 Park ES, Golding J, Carswell F, Stewart-Brown S. Preschool wheezing and prognosis at 10. *Arch Dis Child* 1986; 61:642-646.
- 2 Yunginger JW, Reed CE, O'Connell EJ, Melton LJI, O'Fallon WM, Silverstein MD. A community-based study of the epidemiology of asthma. Incidence rates, 1964-1983. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:888-894.
- 3 Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Gotz M, Helms PJ, Hunt J, Liu A, Papadopoulos N, Platts-Mills T, Pohunek P, Simons FE, Valovirta E, Wahn U, Wildhaber J. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008; 63:5-34.
- 4 Morais-Almeida M, Gaspar A, Rosado-Pinto J. Epidemiology of asthma in Portugal, Cape Verde, and Macao. *Pediatr Pulmonol* 2001; Suppl 23:35-37.
- 5 Morais-Almeida M, Nunes C, Gaspar A, Falcão H, Branco-Ferreira M, Todo-Bom A, Loureiro C, Moreira A, Delgado L. Rinite em idade pré-escolar: Prevalência e caracterização-Estudo ARPA Kids. *Rev Port Imunoalergologia* 2007; 5:387-410.
- 6 Morais-Almeida M, Gaspar A, Pires G, Prates S, Rosado-Pinto J. Risk factors for asthma symptoms at school age: an 8-year prospective study. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28:183-189.
- 7 Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995; 332:133-138.
- 8 Martinez FD, Godfrey S. Wheezing disorders in the preschool child. New York: Martin Dunitz, 2003
- 9 Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Martinez FD. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:661-675.

- 10 De Sario M, Di Domenicantonio R, Corbo G, Forastiere F, Pistelli R, Rusconi F, Sammarro S, Serra MG, Compagnucci P, Perucci CA. Characteristics of early transient, persistent, and late onset wheezers at 9 to 11 years of age. *J Asthma* 2006; 43:633-638.
- 11 Sherriff A, Peters TJ, Henderson J, Strachan D. Risk factor associations with wheezing patterns in children followed longitudinally from birth to 3(1/2) years. *Int J Epidemiol* 2001; 30:1473-1484.
- 12 Martinez FD. Recognizing early asthma. *Allergy* 1999; 54 Suppl 49:24-28.
- 13 Phelan PD. Asthma in children: epidemiology. *BMJ* 1994; 308:1584-1585.
- 14 Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Herbison GP, Silva PA, Poulton R. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003; 349:1414-1422.
- 15 Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet* 2007; 370:758-764.
- 16 Taussig LM, Wright AL, Morgan WJ, Harrison HR, Ray CG. The Tucson Children's Respiratory Study. I. Design and implementation of a prospective study of acute and chronic respiratory illness in children. *Am J Epidemiol* 1989; 129:1219-1231.
- 17 Martinez FD. Viruses and atopic sensitization in the first years of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:S95-S99.
- 18 Stein RT, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Lombardi E, Taussig L, Martinez FD. Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* 1997; 52:946-952.
- 19 Stein RT, Martinez FD. Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5:155-161.
- 20 Gavriely N, Kelly KB, Grothberg JB, Loring SH. Forced expiratory wheezes are a manifestation of airway flow limitation. *J Appl Physiol* 1987; 62:2398-2403.

- 21 Strachan DP, Butland BK, Anderson HR. Incidence and prognosis of asthma and wheezing illness from early childhood to age 33 in a national British cohort. *BMJ* 1996; 312:1195-1199.
- 22 Williams H, McNicol KN. Prevalence, natural history, and relationship of wheezy bronchitis and asthma in children. An epidemiological study. *Br Med J* 1969; 4:321-325.
- 23 Kelly WJ, Burke RE. Apoptotic neuron death in rat substantia nigra induced by striatal excitotoxic injury is developmentally dependent. *Neurosci Lett* 1996; 220:85-88.
- 24 Rusconi F, Galassi C, Corbo GM, Forastiere F, Biggeri A, Ciccone G, Renzoni E. Risk factors for early, persistent, and late-onset wheezing in young children. SIDRIA Collaborative Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1617-1622.
- 25 Speer CP, Silverman M. Issues relating to children born prematurely. *Eur Respir J Suppl* 1998; 27:13s-16s.
- 26 Dezateux C, Stocks J, Wade AM, Dundas I, Fletcher ME. Airway function at one year: association with premorbid airway function, wheezing, and maternal smoking. *Thorax* 2001; 56:680-686.
- 27 Dezateux C, Stocks J, Dundas I, Fletcher ME. Impaired airway function and wheezing in infancy: the influence of maternal smoking and a genetic predisposition to asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:403-410.
- 28 Hofhuis W, de Jongste JC, Merkus PJ. Adverse health effects of prenatal and postnatal tobacco smoke exposure on children. *Arch Dis Child* 2003; 88:1086-1090.
- 29 Stein RT, Holberg CJ, Sherrill D, Wright AL, Morgan WJ, Taussig L, Martinez FD. Influence of parental smoking on respiratory symptoms during the first decade of life: the Tucson Children's Respiratory Study. *Am J Epidemiol* 1999; 149:1030-1037.
- 30 Stocks J, Dezateux C. The effect of parental smoking on lung function and development during infancy. *Respirology* 2003; 8:266-285.
- 31 Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343:538-543.

- 32 Wright AL, Holberg CJ, Martinez FD, Morgan WJ, Taussig LM. Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. Group Health Medical Associates. *BMJ* 1989; 299:946-949.
- 33 Martinez FD, Wright AL, Holberg CJ, Morgan WJ, Taussig LM. Maternal age as a risk factor for wheezing lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1992; 136:1258-1268.
- 34 Turner SW, Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Judge PK, Young S, Landau LI, le Souef PN. Infants with flow limitation at 4 weeks: outcome at 6 and 11 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1294-1298.
- 35 Zeiger RS, Dawson C, Weiss S. Relationships between duration of asthma and asthma severity among children in the Childhood Asthma Management Program (CAMP). *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:376-387.
- 36 Martinez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:S76-S82.
- 37 Illi S, von ME, Lau S, Niggemann B, Gruber C, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet* 2006; 368:763-770.
- 38 Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:709-714.
- 39 Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* 1991; 325:1067-1071.
- 40 Sherrill DL, Stein R, Halonen M, Holberg CJ, Wright A, Martinez FD. Total serum IgE and its association with asthma symptoms and allergic sensitization among children. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:28-36.
- 41 Karakoc F, Remes ST, Martinez FD, Wright AL. The association between persistent eosinophilia and asthma in childhood is independent of atopic status. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:51-56.

- 42 Bacharier LB, Phillips BR, Bloomberg GR, Zeiger RS, Paul IM, Krawiec M, Guilbert T, Chinchilli VM, Strunk RC. Severe intermittent wheezing in preschool children: a distinct phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:604-610.
- 43 Devulapalli CS, Carlsen KC, Haland G, Munthe-Kaas MC, Pettersen M, Mowinckel P, Carlsen KH. Severity of obstructive airways disease by age 2 years predicts asthma at 10 years of age. *Thorax* 2008; 63:8-13.
- 44 Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. 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 Tariq SM, Matthews SM, Hakim EA, Stevens M, Arshad SH, Hide DW. The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:587-593.
- 46 Sears MR, Holdaway MD, Flannery EM, Herbison GP, Silva PA. Parental and neonatal risk factors for atopy, airway hyper-responsiveness, and asthma. *Arch Dis Child* 1996; 75:392-398.
- 47 von Mutius E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:S525-S532.
- 48 Bray GW. The hereditary factor in hyperresponsiveness, anaphylaxis and allergy. *J Allergy* 1931; 2:205-224.
- 49 Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:176-181.
- 50 Cookson WO, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Nakumuura Y. Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 1992; 340:381-384.
- 51 Dold S, Wjst M, von Mutius E, Reitmeir P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 1992; 67:1018-1022.
- 52 Van Asperen PP, Kemp AS, Mukhi A. Atopy in infancy predicts the severity of bronchial hyperresponsiveness in later childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:790-795.

- 53 Van Asperen PP, Mukhi A. Role of atopy in the natural history of wheeze and bronchial hyper-responsiveness in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5:178-183.
- 54 Anderson HR, Pottier AC, Strachan DP. Asthma from birth to age 23: incidence and relation to prior and concurrent atopic disease. *Thorax* 1992; 47:537-542.
- 55 Butland BK, Strachan DP. Asthma onset and relapse in adult life: the British 1958 birth cohort study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98:337-343.
- 56 Celedon JC, Litonjua AA, Ryan L, Weiss ST, Gold DR. Day care attendance, respiratory tract illnesses, wheezing, asthma, and total serum IgE level in early childhood. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002; 156:241-245.
- 57 Nickel R, Lau S, Niggemann B, Gruber C, von ME, Illi S, Kulig M, Wahn U. Messages from the German Multicentre Allergy Study. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13 Suppl 15:7-10.
- 58 Rhodes HL, Thomas P, Sporik R, Holgate ST, Cogswell JJ. A birth cohort study of subjects at risk of atopy: twenty-two-year follow-up of wheeze and atopic status. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:176-180.
- 59 Fiocchi A, Terracciano L, Martelli A, Guerriero F, Bernardo L. The natural history of childhood-onset asthma. *Allergy Asthma Proc* 2006; 27:178-185.
- 60 Just J, Nicoloyanis N, Chauvin M, Pribil C, Grimfeld A, Duru G. Lack of eosinophilia can predict remission in wheezy infants? *Clin Exp Allergy* 2008; 38:767-773.
- 61 Piippo-Savolainen E, Remes S, Korppi M. Does blood eosinophilia in wheezing infants predict later asthma? A prospective 18-20-year follow-up. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28:163-169.
- 62 Piippo-Savolainen E, Korppi M. Wheezy babies--wheezy adults? Review on long-term outcome until adulthood after early childhood wheezing. *Acta Paediatr* 2008; 97:5-11.
- 63 Cooper PJ, Ayre G, Martin C, Rizzo JA, Ponte EV, Cruz AA. Geohelminth infections: a review of the role of IgE and assessment of potential risks of anti-IgE treatment. *Allergy* 2008; 63:409-417.

- 64 Warner JA, Jones CA, Jones AC, Warner JO. Prenatal origins of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:S493-S498.
- 65 Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med* 1990; 323:502-507.
- 66 Sporik R, Holgate ST, Cogswell JJ. Natural history of asthma in childhood--a birth cohort study. *Arch Dis Child* 1991; 66:1050-1053.
- 67 Wilson NM, Phagoo SB, Silverman M. Atopy, bronchial responsiveness, and symptoms in wheezy 3 year olds. *Arch Dis Child* 1992; 67:491-495.
- 68 Kuehr J, Frischer T, Meinert R, Barth R, Schraub S, Urbanek R, Karmaus W, Forster J. Sensitization to mite allergens is a risk factor for early and late onset of asthma and for persistence of asthmatic signs in children. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:655-662.
- 69 Piippo-Savolainen E, Remes S, Korppi M. Does early exposure or sensitization to inhalant allergens predict asthma in wheezing infants? A 20-year follow-up. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28:454-461.
- 70 Rhodes HL, Sporik R, Thomas P, Holgate ST, Cogswell JJ. Early life risk factors for adult asthma: a birth cohort study of subjects at risk. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:720-725.
- 71 Melen E, Wickman M, Nordvall SL, Hage-Hamsten M, Lindfors A. Influence of early and current environmental exposure factors on sensitization and outcome of asthma in pre-school children. *Allergy* 2001; 56:646-652.
- 72 Remes ST, Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Dog exposure in infancy decreases the subsequent risk of frequent wheeze but not of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:509-515.
- 73 Ownby DR, Johnson CC, Peterson EL. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *JAMA* 2002; 288:963-972.
- 74 Kulig M, Bergmann R, Tacke U, Wahn U, Guggenmoos-Holzmann I. Long-lasting sensitization to food during the first two years precedes allergic airway disease. The MAS Study Group, Germany. *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9:61-67.

- 75 Nickel R, Kulig M, Forster J, Bergmann R, Bauer CP, Lau S, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U. Sensitization to hen's egg at the age of twelve months is predictive for allergic sensitization to common indoor and outdoor allergens at the age of three years. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:613-617.
- 76 Zeiger RS, Heller S. The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:1179-1190.
- 77 Weitzman M, Gortmaker S, Walker DK, Sobol A. Maternal smoking and childhood asthma. *Pediatrics* 1990; 85:505-511.
- 78 Martinez FD, Cline M, Burrows B. Increased incidence of asthma in children of smoking mothers. *Pediatrics* 1992; 89:21-26.
- 79 Murray AB, Morrison BJ. The effect of cigarette smoke from the mother on bronchial responsiveness and severity of symptoms in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:575-581.
- 80 Ronchetti R, Bonci E, Cutrera R, De Castro G, Indinnimeo L, Midulla F, Tancredi G, Martinez FD. Enhanced allergic sensitisation related to parental smoking. *Arch Dis Child* 1992; 67:496-500.
- 81 Halken S, Host A, Nilsson L, Taudorf E. Passive smoking as a risk factor for development of obstructive respiratory disease and allergic sensitization. *Allergy* 1995; 50:97-105.
- 82 Gergen PJ. Environmental tobacco smoke as a risk factor for respiratory disease in children. *Respir Physiol* 2001; 128:39-46.
- 83 Gilliland FD, Li YF, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:429-436.
- 84 O'Connor GT, Weiss ST, Tager IB, Speizer FE. The effect of passive smoking on pulmonary function and nonspecific bronchial responsiveness in a population-based sample of children and young adults. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:800-804.

- 85 Chilmonczyk BA, Salmun LM, Megathlin KN, Neveux LM, Palomaki GE, Knight GJ, Pulkkinen AJ, Haddow JE. Association between exposure to environmental tobacco smoke and exacerbations of asthma in children. *N Engl J Med* 1993; 328:1665-1669.
- 86 Evans D, Levison MJ, Feldman CH, Clark NM, Wasilewski Y, Levin B, Mellins RB. The impact of passive smoking on emergency room visits of urban children with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:567-572.
- 87 Azizi BH, Zulkifli HI, Kasim S. Indoor air pollution and asthma in hospitalized children in a tropical environment. *J Asthma* 1995; 32:413-418.
- 88 Macarthur C, Calpin C, Parkin PC, Feldman W. Factors associated with pediatric asthma readmissions. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:992-993.
- 89 Gaspar A, Morais-Almeida M, Pires G, Prates S, Camara R, Godinho N, Arede C, Rosado-Pinto J. Risk factors for asthma admissions in children. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23:295-301.
- 90 Welliver RC, Wong DT, Sun M, Middleton E Jr, Vaughan RS, Ogra PL. The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N Engl J Med* 1981; 305:841-846.
- 91 Martinez FD. Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood: could they be protective? *Thorax* 1994; 49:1189-1191.
- 92 Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1501-1507.
- 93 Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001; 322:390-395.
- 94 Clough JB, Keeping KA, Edwards LC, Freeman WM, Warner JA, Warner JO. Can we predict which wheezy infants will continue to wheeze? *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1473-1480.
- 95 Sakula A. A history of asthma. The FitzPatrick lecture 1987. *J R Coll Physicians Lond* 1988; 22:36-44.

- 96 Marketos SG, Ballas CN. Bronchial asthma in the medical literature of Greek antiquity. *J Asthma* 1982; 19:263-269.
- 97 Muntner S. Maimonides' treatise on asthma. *Dis Chest* 1968; 54:128-132.
- 98 Sakula A. Moses Maimonides' Treatise on Asthma. *Thorax* 1981; 36:560.
- 99 Garty BZ. Maimonides' treatise on asthma. Part I: Background. *Harefuah* 1995; 129:603-605.
- 100 Garty BZ. Maimonides' treatise on asthma, Part II: Text. *Harefuah* 1996; 130:49-52.
- 101 Pagel W, Rattansi P. Vesalius and Paracelsus. *Med Hist* 1964; 8:309-328.
- 102 Sakula A. Sir John Floyer's A Treatise of the Asthma (1698). *Thorax* 1984; 39:248-254.
- 103 Butenandt A. Adolph Windaws. *Munch Med Wochenschr* 1960; 102:1755-1757.
- 104 Dale HH, Laidlaw PP. Histamine shock. *J Physiol* 1919; 52:355-390.
- 105 Dale HH, Laidlaw PP. Further observations on the action of beta-aminazolyethylamine. *J Physiol* 1911; 43:182-195.
- 106 Dale HH, Laidlaw PP. The physiological action of beta-aminazolyethylamine. *J Physiol* 1910; 41:318-344.
- 107 Cohen S, Dworetzky M, Frick OL. Coca and Cooke on the classification of hypersensitiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:205-210.
- 108 Chase MW. Irreverent recollections from Cooke and Coca, 1928-1978. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64:306-320.
- 109 Terminology, definitions and classifications of chronic pulmonary emphysema and related conditions: A report of the conclusions of a Ciba Guest Symposium. *Thorax* 1959; 14:286-299.
- 110 Carryer HM, Koelsche GA, Prickman LE, Maytum CK, Lake CF, Williams HL. Effects of cortisone on bronchial asthma and hay fever occurring in subjects sensitive to ragweed pollen. *Mayo Clin Proc* 1950; 25:482-486.

- 111 American Thoracic Society. Chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:224-225.
- 112 Gowans JL. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol* 1959; 146:54-69.
- 113 Gowans JL. The life-history of lymphocytes. *Br Med Bull* 1959; 15:50-53.
- 114 Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Blocking of Prausnitz-Kuestner sensitization with reagin by normal human beta-2A globulin. *J Allergy Clin Immunol* 1963; 34:395-403.
- 115 Johansson SG, Bennich H. Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology* 1967; 13:381-394.
- 116 David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 56:72-77.
- 117 Dumonde DC, Wolstencroft RA, Panayi GS, Matthew M, Morley J, Howson WT. "Lymphokines": non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature* 1969; 224:38-42.
- 118 Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol* 1974; 12:150-159.
- 119 Samuelsson B. Brook Lodge symposium on prostaglandins. Moderator's summary. *J Reprod Med* 1972; 9:376-377.
- 120 Borgeat P, Samuelsson B. Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds. *J Biol Chem* 1979; 254:7865-7869.
- 121 Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:3213-3217.
- 122 Samuelsson B, Borgeat P, Hammarstrom S, Murphy RC. Introduction of a nomenclature: leukotrienes. *Prostaglandins* 1979; 17:785-787.

- 123 Borgeat P, Hamberg M, Samuelsson B. Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J Biol Chem* 1976; 251:7816-7820.
- 124 Sanderson CJ, O'Garra A, Warren DJ, Klaus GG. Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: proposed name interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:437-440.
- 125 Sanderson CJ, Warren DJ, Strath M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation in vitro. Its relationship to interleukin 3, and functional properties of eosinophils produced in cultures. *J Exp Med* 1985; 162:60-74.
- 126 Warren DJ, Sanderson CJ. Production of a T-cell hybrid producing a lymphokine stimulating eosinophil differentiation. *Immunology* 1985; 54:615-623.
- 127 Sheffer AL. Global Initiative for Asthma: NHLBI/WHO Workshop report. Global Strategy for Asthma management and prevention. Bethesda, USA: NIH Publication, 1995.
- 128 Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:893-910.
- 129 Howarth PH. The airway inflammatory response in allergic asthma and its relationship to clinical disease. *Allergy* 1995; 50:13-21.
- 130 Michel BF, Neukirch F, Bousquet J. Asthme: un problème mondiale de Santé Publique. *Bull Acad Natle Méd* 1995; 179:279-297.
- 131 Forero R, Bauman A, Young L, Larkin P. Asthma prevalence and management in Australian adolescents: results from three community surveys. *J Adolesc Health* 1992; 13:707-712.
- 132 Burney PG, Chinn S, Rona RJ. Has the prevalence of asthma increased in children? Evidence from the national study of health and growth 1973-86. *BMJ* 1990; 300:1306-1310.
- 133 Burr ML, Butland BK, King S, Vaughan-Williams E. Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart. *Arch Dis Child* 1989; 64:1452-1456.
- 134 Sears MR. Descriptive epidemiology of asthma. *Lancet* 1997; 350 Suppl 2:S2-1-S2-4.

- 135 Lee DA, Winslow NR, Speight AN, Hey EN. Prevalence and spectrum of asthma in childhood. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983; 286:1256-1258.
- 136 Rosado Pinto JE. Prevalence of asthma and rhinitis in Portuguese teenagers (ISAAC). *Eur Respir J* 1996; 9:233S.
- 137 Becklake MR, Ernst P. Environmental factors. *Lancet* 1997; 350 Suppl 2:S2-10-S2-13.
- 138 Robertson CF, Heycock E, Bishop J, Nolan T, Olinsky A, Phelan PD. Prevalence of asthma in Melbourne schoolchildren: changes over 26 years. *BMJ* 1991; 302:1116-1118.
- 139 Peat JK, van den Berg RH, Green WF, Mellis CM, Leeder SR, Woolcock AJ. Changing prevalence of asthma in Australian children. *BMJ* 1994; 308:1591-1596.
- 140 Burney PG, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1994; 7:954-960.
- 141 Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* 1995; 8:483-491.
- 142 Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998; 12:315-335.
- 143 Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, Hage-Hamsten M, Wuthrich B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56:813-824.
- 144 Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van CP, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:832-836.
- 145 Morais-Almeida M, Almeida T, Sampaio G, Romeira A, Braga C, Gaspar A, Rosado Pinto J. ISAAC Fase II - Lisboa. In: Rosado Pinto J, Morais-Almeida M, editors. *A Criança Asmática no Mundo da Alergia*. Miraflores, Portugal: Euromédice Lda, 2003: 41-43.

- 146 Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006; 368:733-743.
- 147 Nunes C, Ladeira S, Rosado Pinto J. Definição, Epidemiologia e Classificação da Asma na Criança. In: Rosado Pinto J, Morais-Almeida M, editors. *A Criança Asmática no Mundo da Alergia*. Miraflores, Portugal: Euromédice Lda, 2003: 35-55.
- 148 Pearce N, Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, Robertson C. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 2007; 62:758-766.
- 149 Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. CD4⁺ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev* 2005; 4:491-496.
- 150 Avni O, Rao A. T cell differentiation: a mechanistic view. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:654-659.
- 151 Viola JP, Rao A. Molecular regulation of cytokine gene expression during the immune response. *J Clin Immunol* 1999; 19:98-108.
- 152 Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:30-37.
- 153 El Biaze M, Boniface S, Koscher V, Mamessier E, Dupuy P, Milhe F, Ramadour M, Vervloet D, Magnan A. T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. *Allergy* 2003; 58:844-853.
- 154 Mazzarella G, Bianco A, Catena E, De Palma R, Abbate GF. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy* 2000; 55 Suppl 61:6-9.
- 155 Larche M. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest* 2007; 132:1007-1014.
- 156 Devos S, Cormont F, Vrtala S, Hooghe-Peters E, Pirson F, Snick J. Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:174-182.
- 157 Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:676-680.

- 158 Nath P, Yee LS, Williams AS, Noble A, Xie S, McKenzie AN, Chung KF. Complete inhibition of allergic airway inflammation and remodelling in quadruple IL-4/5/9/13-/- mice. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1427-1435.
- 159 Umezu-Goto M, Kajiyama Y, Kobayashi N, Kaminuma O, Suko M, Mori A. IL-9 production by peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 143 Suppl 1:76-79.
- 160 Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2004; 202:175-190.
- 161 Lei Z, Liu G, Huang Q, Lv M, Zu R, Zhang GM, Feng ZH, Huang B. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy* 2008; 63:327-332.
- 162 Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.
- 163 Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, Durham SR. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8:35-42.
- 164 Meiler F, Zimmermann M, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006; 6:91-96.
- 165 Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:796-802.
- 166 Uekert SJ, Akan G, Evans MD, Li Z, Roberg K, Tisler C, Dasilva D, Anderson E, Gangnon R, Allen DB, Gern JE, Lemanske RF, Jr. Sex-related differences in immune development and the expression of atopy in early childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:1375-1381.
- 167 Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299:1259-1260.
- 168 Matricardi PM, Bouygue GR, Tripodi S. Inner-city asthma and the hygiene hypothesis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89:69-74.

- 169 Kalliomaki M, Isolauri E. Pandemic of atopic diseases--a lack of microbial exposure in early infancy? *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; 2:193-199.
- 170 Matricardi PM. The role of early infections, hygiene and intestinal microflora. *Pediatr Pulmonol Suppl* 2004; 26:211-212.
- 171 Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von ME. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347:869-877.
- 172 Romagnani S. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy* 2006; 61:3-14.
- 173 Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 103:175-183.
- 174 Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:627-633.
- 175 Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347:911-920.
- 176 Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, DeKruyff RH, Umetsu DT. CD4⁺ T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest* 2000; 105:61-70.
- 177 Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman CG, DeKruyff RH, Umetsu DT. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:460-468.
- 178 Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van RR. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002; 296:490-494.
- 179 Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, Tarbell KV, Talmor M, Ravetch JV, Inaba K, Steinman RM. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:2758-2763.

- 180 Hubert P, Jacobs N, Caberg JH, Boniver J, Delvenne P. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J Leukoc Biol* 2007; 82:781-794.
- 181 Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198:235-247.
- 182 Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25⁺ CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004; 199:1467-1477.
- 183 Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol* 2004; 16:1769-1780.
- 184 Mahnke K, Enk AH. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 293:133-150.
- 185 Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett* 2004; 94:11-26.
- 186 Tan PH, Yates JB, Xue SA, Chan C, Jordan WJ, Harper JE, Watson MP, Dong R, Ritter MA, Lechler RI, Lombardi G, George AJ. Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression. *Blood* 2005; 106:2936-2943.
- 187 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T_H17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441:235-238.
- 188 Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26:371-381.
- 189 Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺ CD4⁺ Tr cells. *Blood* 2005; 105:1162-1169.

- 190 Lu L, Lee WC, Takayama T, Qian S, Gambotto A, Robbins PD, Thomson AW. Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4Ig). *J Leukoc Biol* 1999; 66:293-296.
- 191 Smits HH, Engering A, van der KD, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van KY, Kapsenberg ML. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1260-1267.
- 192 Hackstein H, Morelli AE, Thomson AW. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol* 2001; 22:437-442.
- 193 Gray CP, Arosio P, Hersey P. Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells. *Blood* 2002; 99:3326-3334.
- 194 Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 2007; 4:269-275.
- 195 Matyszak MK, Citterio S, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 2000; 30:1233-1242.
- 196 Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164:2405-2411.
- 197 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-1164.
- 198 Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:253-257.
- 199 Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212:8-27.

- 200 Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4⁺CD25⁺ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001; 31:1247-1254.
- 201 Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 2005; 202:901-906.
- 202 Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 162:5317-5326.
- 203 Liston A, Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:176-185.
- 204 Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 2005; 4:579-586.
- 205 Hauben E, Roncarolo MG. Human CD4⁺ regulatory T cells and activation-induced tolerance. *Microbes Infect* 2005; 7:1023-1032.
- 206 Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265:1237-1240.
- 207 Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:68-79.
- 208 Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Becourt C, Lucas B. Peripheral CD8⁺CD25⁺ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 2005; 175:246-253.
- 209 Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood* 2003; 102:4107-4114.
- 210 Baecher-Allan C, Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 2004; 200:273-276.

- 211 Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J Immunol* 2004; 172:5967-5972.
- 212 Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:227-235.
- 213 Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002; 196:1335-1346.
- 214 Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25⁺CD4⁺ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 2000; 12:1145-1155.
- 215 Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998; 160:1212-1218.
- 216 Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172:4676-4680.
- 217 Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004; 21:589-601.
- 218 Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363:608-615.
- 219 Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193:1285-1294.
- 220 Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192:295-302.

- 221 Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192:303-310.
- 222 de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004; 34:2480-2488.
- 223 Zheng G, Wang B, Chen A. The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 173:2428-2434.
- 224 Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3:135-142.
- 225 McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16:311-323.
- 226 Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, Ayroldi E, Riccardi C. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* 2004; 34:613-622.
- 227 Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SL, Kosiewicz MM. Conversion of CD4⁺CD25⁻ cells into CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vivo requires B7 co-stimulation, but not the thymus. *J Exp Med* 2005; 201:127-137.
- 228 Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004; 34:2996-3005.
- 229 Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10398-10403.
- 230 Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21:503-513.

- 231 Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004; 34:623-630.
- 232 Bopp T, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Schmitt S, Richter C, Klein M, Schild H, Schmitt E, Stassen M. NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4⁺ T lymphocytes by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201:181-187.
- 233 Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167:1245-1253.
- 234 Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:4103-4108.
- 235 Jartti T, Burmeister KA, Seroogy CM, Jennens-Clough ML, Tisler CJ, Salazar LP, Dasilva DF, Evans MD, Vrtis RF, Wallace PK, Ruiz-Perez B, Gangnon RE, Lemanske RF, Jr., Gern JE. Association between CD4⁺CD25^{high} T cells and atopy in children. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:177-183.
- 236 Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Clin Immunol* 2005; 115:10-18.
- 237 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330-336.
- 238 Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4:337-342.
- 239 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-1061.
- 240 Reefer AJ, Satinover SM, Solga MD, Lannigan JA, Nguyen JT, Wilson BB, Woodfolk JA. Analysis of CD25^{hi}CD4⁺ "regulatory" T-cell subtypes in atopic dermatitis reveals a novel T_H2-like population. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2):415-422.e3.

- 241 Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* 2005; 115:3276-3284.
- 242 Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:209-226.
- 243 Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. TGF-beta induces Foxp3⁺ T-regulatory cells from CD4⁺C25⁻ precursors. *Am J Transplant* 2004; 4:1614-1627.
- 244 Lin YL, Shieh CC, Wang JY. The functional insufficiency of human CD4⁺CD25^{high} T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy* 2008; 63:67-74.
- 245 Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005; 35:1681-1691.
- 246 Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der ZL, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005; 66:13-20.
- 247 Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198:1875-1886.
- 248 Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16:1643-1656.
- 249 Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24:179-189.
- 250 Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005; 4:351-363.

- 251 Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25:195-201.
- 252 Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25⁺ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4⁺ T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196:255-260.
- 253 Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:207-214.
- 254 Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737-742.
- 255 Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212:28-50.
- 256 Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; 195:603-616.
- 257 Sundstedt A, Hoiden I, Rosendahl A, Kalland T, van Rooijen N, Dohlsten M. Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol* 1997; 158:180-186.
- 258 Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, Nasorri F, Bianchi G, Traidl C, Sozzani S, Girolomoni G, Cavani A. Chemokine receptor expression and function in CD4⁺ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol* 2001; 166:996-1002.
- 259 Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6:331-337.
- 260 Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002; 8:1024-1032.

- 261 Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol* 2004; 5:1149-1156.
- 262 Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:69-75.
- 263 Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:430-435.
- 264 Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
- 265 Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:271-283.
- 266 Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106.
- 267 Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse RC, de KN, Suriyaarachchi D, Serralha M, Holt BJ, Hollams E, Yerkovich S, Holt K, Sly PD, Goldblatt J, Le SP, Holt PG. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet* 2005; 365:142-149.
- 268 Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Tsuda M, Ikegami T, Kibe A, Yoshiura Y, Komori M, Hamasaki N, Aizawa H, Nakanishi Y. Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134:295-302.
- 269 Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy - review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55:241-269.
- 270 Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 2001; 167:4245-4253.

- 271 Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199:1567-1575.
- 272 Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:862-868.
- 273 Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004; 199:1679-1688.
- 274 Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest* 2003; 111:1065-1072.
- 275 Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:756-763.
- 276 Grindebacke H, Wing K, Andersson AC, Suri-Payer E, Rak S, Rudin A. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1364-1372.
- 277 Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad e, Lehr HA, Schmitt E, Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. The IL-6R alpha chain controls lung CD4⁺CD25⁺ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 2005; 115:313-325.
- 278 Jaffar Z, Sivakuru T, Roberts K. CD4⁺CD25⁺ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J Immunol* 2004; 172:3842-3849.
- 279 Suto A, Nakajima H, Kagami SI, Suzuki K, Saito Y, Iwamoto I. Role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:680-687.

- 280 Shi HZ, Li S, Xie ZF, Qin XJ, Qin X, Zhong XN. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol* 2004; 113:172-178.
- 281 Haddeland U, Karstensen AB, Farkas L, Bo KO, Pirhonen J, Karlsson M, Kvakik W, Brandtzaeg P, Nakstad B. Putative regulatory T cells are impaired in cord blood from neonates with hereditary allergy risk. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16:104-112.
- 282 Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, Griese M, Krauss-Etschmann S. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1258-1266.
- 283 Hoffmann HJ, Malling TM, Topcu A, Ryder LP, Nielsen KR, Varming K, Dahl R, Omland O, Sigsgaard T. CD4^{dim}CD25^{bright} Treg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytometry A* 2007; 71:371-378.
- 284 Barnes PJ. Molecular mechanisms of steroid action in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:159-168.
- 285 Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:669-674.
- 286 Meijer RJ, Kerstjens HA, Arends LR, Kauffman HF, Koeter GH, Postma DS. Effects of inhaled fluticasone and oral prednisolone on clinical and inflammatory parameters in patients with asthma. *Thorax* 1999; 54:894-899.
- 287 Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM. Differential response of murine CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells to dexamethasone-induced cell-death. *Eur J Immunol* 2004; 34:859-869.
- 288 Dao N, X, Robinson DS. Fluticasone propionate increases CD4CD25 T regulatory cell suppression of allergen-stimulated CD4CD25 T cells by an IL-10-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:296-301.
- 289 Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, Mantel PY, Menz G, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1425-1433.

- 290 Schaub B, Campo M, He H, Perkins D, Gillman MW, Gold DR, Weiss S, Lieberman E, Finn PW. Neonatal immune responses to TLR2 stimulation: influence of maternal atopy on Foxp3 and IL-10 expression. *Respir Res* 2006; 7:40.
- 291 Pereira-Santos MC, Baptista AP, Melo A, Alves RR, Soares RS, Pedro E, Pereira-Barbosa M, Victorino RM, Sousa AE. Expansion of circulating Foxp3⁺CD25^{bright} CD4⁺ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:291-297.
- 292 Till SJ, Durham SR. Immunological responses to allergen immunotherapy. *Clin Allergy Immunol* 2004; 18:85-104.
- 293 Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1025-1034.
- 294 Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59:897-913.
- 295 Varney VA, Gaga M, Frew AJ, Aber VR, Kay AB, Durham SR. Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by antiallergic drugs. *BMJ* 1991; 302:265-269.
- 296 Bousquet J, Calvayrac P, Guerin B, Hejjaoui A, Dhivert H, Hewitt B, Michel FB. Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. I. In vivo and in vitro parameters after a short course of treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76:734-744.
- 297 Varney VA, Edwards J, Tabbah K, Brewster H, Mavroleon G, Frew AJ. Clinical efficacy of specific immunotherapy to cat dander: a double-blind placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:860-867.
- 298 Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, Creticos PJ, Dayer JM, Durham SR, Demoly P, Goldstein RJ, Ishikawa T, Ito K, Kraft D, Lambert PH, Lowenstein H, Muller U, Norman PS, Reisman RE, Valenta R, Valovirta E, Yssel H. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81:401-405.
- 299 Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Host A, Jacobsen L, Koivikko A, Koller DY, Niggemann B, Norberg LA, Urbanek R, Valovirta E, Wahn U. Pollen

immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:251-256.

- 300 Des RA, Paradis L, Menardo JL, Bouges S, Daures JP, Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:450-453.
- 301 Nagato T, Kobayashi H, Yanai M, Sato K, Aoki N, Oikawa K, Kimura S, Abe Y, Celis E, Harabuchi Y, Tateno M. Functional analysis of birch pollen allergen Bet v 1-specific regulatory T cells. *J Immunol* 2007; 178:1189-1198.
- 302 Woodfolk JA. T-cell responses to allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:280-294.
- 303 Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:707-713.
- 304 Ciprandi G, Fenoglio D, Cirillo I, Milanese M, Minuti P. Sublingual immunotherapy and regulatory T cells. *Allergy* 2006; 61:511-513.
- 305 Savolainen J, Jacobsen L, Valovirta E. Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy* 2006; 61:1184-1190.
- 306 Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszcz M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33:1205-1214.
- 307 Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2:725-731.
- 308 Cosmi L, Santarlasci V, Angeli R, Liotta F, Maggi L, Frosali F, Rossi O, Falagiani P, Riva G, Romagnani S, Annunziato F, Maggi E. Sublingual immunotherapy with *Dermatophagoides* monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-gamma- and interleukin-10-production. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:261-272.

- 309 Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999; 402:B5-11.
- 310 Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402:B2-B4.
- 311 Koppelman GH, Los H, Postma DS. Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies. *Eur Respir J* 1999; 13:2-4.
- 312 Black JA, Lewis HE, Thacker CK, Thould AK. Tristan da Cunha: General Medical Investigations. *Br Med J* 1963; 5364:1013-1024.
- 313 Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1351-1358.
- 314 Nieminen MM, Kaprio J, Koskenvuo M. A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest* 1991; 100:70-75.
- 315 Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res* 2008; 9:4.
- 316 Blumenthal MN. The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:141-145.
- 317 Lind DL, Choudhry S, Ung N, Ziv E, Avila PC, Salari K, Ha C, Lovins EG, Coyle NE, Nazario S, Casal J, Torres A, Rodriguez-Santana JR, Matallana H, Lilly CM, Salas J, Selman M, Boushey HA, Weiss ST, Chapela R, Ford JG, Rodriguez-Cintron W, Silverman EK, Sheppard D, Kwok PY, Gonzalez BE. ADAM33 is not associated with asthma in Puerto Rican or Mexican populations. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1312-1316.
- 318 Cookson WO. Asthma genetics. *Chest* 2002; 121:7S-13S.
- 319 Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res* 2003; 4:14.
- 320 Hoffjan S, Ober C. Present status on the genetic studies of asthma. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:709-717.
- 321 Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet* 2005; 46:93-104.

- 322 Wills-Karp M, Ewart SL. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet* 2004; 5:376-387.
- 323 Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, Bleecker ER. Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 2002; 70:230-236.
- 324 Xu J, Meyers DA, Ober C, Blumenthal MN, Mellen B, Barnes KC, King RA, Lester LA, Howard TD, Solway J, Langefeld CD, Beaty TH, Rich SS, Bleecker ER, Cox NJ. Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three U.S. populations: collaborative study on the genetics of asthma. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1437-1446.
- 325 Morton NE. Genetic epidemiology, genetic maps and positional cloning. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358:1701-1708.
- 326 Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D. Quality and completeness of SNP databases. *Nat Genet* 2003; 33:457-458.
- 327 Allison DB, Beasley M. Method and computer program for controlling the family-wise alpha rate in gene association studies involving multiple phenotypes. *Genet Epidemiol* 1998; 15:87-101.
- 328 Lee WC. Searching for disease-susceptibility loci by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium in a gene bank of affected individuals. *Am J Epidemiol* 2003; 158:397-400.
- 329 Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Souef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996; 383:247-250.
- 330 A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Nat Genet* 1997; 15:389-392.
- 331 Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Nance M, Pettersson A, Prescott J, Richardson A, Schlenker E, Summerhill E, Willadsen S, Parry R. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1393-1398.

- 332 Hizawa N, Freidhoff LR, Chiu YF, Ehrlich E, Luehr CA, Anderson JL, Duffy DL, Dunston GM, Weber JL, Huang SK, Barnes KC, Marsh DG, Beaty TH. Genetic regulation of *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE responsiveness: a genome-wide multipoint linkage analysis in families recruited through 2 asthmatic sibs. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:436-442.
- 333 Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, Reis A, Ulbrecht M, Gomolka M, Weiss EH, Jaeger L, Nickel R, Richter K, Kjellman NI, Griese M, von Berg A, Gappa M, Riedel F, Boehle M, van Koningsbruggen S, Schoberth P, Szczepanski R, Dorsch W, Silbermann M, Wichmann HE. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 1999; 58:1-8.
- 334 Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, Charpin D, Degioanni A, Gormand F, Grimfeld A, Hochez J, Hyne G, Lockhart A, Luillier-Lacombe M, Matran R, Meunier F, Neukirch F, Pacheco Y, Parent V, Paty E, Pin I, Pison C, Scheinmann P, Thobie N, Vervloet D, Kauffmann F, Feingold J, Lathrop M, Demenais F. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1812-1818.
- 335 Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, Nishihara M, Yamakawa-Kobayashi K, Takeda K, Imoto N, Ichikawa K, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics* 2000; 66:152-160.
- 336 Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1154-1162.
- 337 Xu X, Fang Z, Wang B, Chen C, Guang W, Jin Y, Yang J, Lewitzky S, Aelony A, Parker A, Meyer J, Weiss ST, Xu X. A genomewide search for quantitative-trait loci underlying asthma. *Am J Hum Genet* 2001; 69:1271-1277.
- 338 Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petays T, Green T, Cargill M, Haahtela T, Lander ES, Laitinen LA, Hudson TJ, Kere J. A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet* 2001; 28:87-91.

- 339 Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benchekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418:426-430.
- 340 Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, Palsson S, Adalsteinsdottir E, Gislason D, Finnbogason G, Gislason T, Kristjansson K, Arnason T, Birkisson I, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K. A major susceptibility gene for asthma maps to chromosome 14q24. *Am J Hum Genet* 2002; 71:483-491.
- 341 Haagerup A, Bjerke T, Schiotz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA. Asthma and atopy - a total genome scan for susceptibility genes. *Allergy* 2002; 57:680-686.
- 342 Postma DS, Meyers DA, Jongepier H, Howard TD, Koppelman GH, Bleecker ER. Genomewide screen for pulmonary function in 200 families ascertained for asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:446-452.
- 343 Meyers DA, Postma DS, Stine OC, Koppelman GH, Ampleford EJ, Jongepier H, Howard TD, Bleecker ER. Genome screen for asthma and bronchial hyperresponsiveness: interactions with passive smoke exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1169-1175.
- 344 Wang JY, Lin CG, Bey MS, Wang L, Lin FY, Huang L, Wu LS. Discovery of genetic difference between asthmatic children with high IgE level and normal IgE level by whole genome linkage disequilibrium mapping using 763 autosomal STR markers. *J Hum Genet* 2005; 50:249-258.
- 345 Hakonarson H, Wjst M. Current concepts on the genetics of asthma. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13:267-277.
- 346 Howard TD, Meyers DA, Bleecker ER. Mapping susceptibility genes for allergic diseases. *Chest* 2003; 123:363S-368S.
- 347 Evans DM, Zhu G, Duffy DL, Montgomery GW, Frazer IH, Martin NG. Major quantitative trait locus for eosinophil count is located on chromosome 2q. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:826-830.

- 348 Koppelman GH, Stine OC, Xu J, Howard TD, Zheng SL, Kauffman HF, Bleecker ER, Meyers DA, Postma DS. Genome-wide search for atopy susceptibility genes in Dutch families with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:498-506.
- 349 Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, Naidu RP, Levett PN, Renault B, Kucherlapati R, Iozzino S, Ehrlich E, Beaty TH, Marsh DG. Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics* 1996; 37:41-50.
- 350 Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, Wahn V, Marsh DG. Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study. *Genomics* 1997; 46:159-162.
- 351 Ludviksson BR, Eiriksson TH, Ardal B, Sigfusson A, Valdimarsson H. Correlation between serum immunoglobulin A concentrations and allergic manifestations in infants. *J Pediatr* 1992; 121:23-27.
- 352 Wiltshire S, Bhattacharyya S, Faux JA, Leaves NI, Daniels SE, Moffatt MF, James A, Musk AW, Cookson WO. A genome scan for loci influencing total serum immunoglobulin levels: possible linkage of IgA to the chromosome 13 atopy locus. *Hum Mol Genet* 1998; 7:27-31.
- 353 Steinke JW, Rich SS, Borish L. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:S384-S387.
- 354 Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, Bhattacharyya S, Tinsley J, Zhang Y, Holt R, Jones EY, Lench N, Carey A, Jones H, Dickens NJ, Dimon C, Nicholls R, Baker C, Xue L, Townsend E, Kabesch M, Weiland SK, Carr D, von Mutius E, Adcock IM, Barnes PJ, Lathrop GM, Edwards M, Moffatt MF, Cookson WO. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet* 2003; 35:258-263.
- 355 Gohlke H, Illig T, Bahnweg M, Klopp N, Andre E, Altmuller J, Herbon N, Werner M, Knapp M, Pescollderung L, Boner A, Malerba G, Pignatti PF, Wjst M. Association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:1217-1223.

- 356 Kabesch M, Carr D, Weiland SK, von Mutius E. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:340-345.
- 357 Jongepier H, Koppelman GH, Nolte IM, Bruinenberg M, Bleecker ER, Meyers DA, te Meerman GJ, Postma DS. Polymorphisms in SPINK5 are not associated with asthma in a Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:486-492.
- 358 Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, Ponting CP, Broxholme J, Holt R, Edser P, Bhattacharyya S, Dunham A, Adcock IM, Pulleyn L, Barnes PJ, Harper JI, Abecasis G, Cardon L, White M, Burton J, Matthews L, Mott R, Ross M, Cox R, Moffatt MF, Cookson WO. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat Genet* 2003; 34:181-186.
- 359 Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, Makela S, Rehn M, Pirskanen A, Rautanen A, Zucchelli M, Gullsten H, Leino M, Alenius H, Petays T, Haahtela T, Laitinen A, Laprise C, Hudson TJ, Laitinen LA, Kere J. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 2004; 304:300-304.
- 360 Kormann MS, Carr D, Klopp N, Illig T, Leupold W, Fritsch C, Weiland SK, von Mutius E, Kabesch M. G-Protein-coupled receptor polymorphisms are associated with asthma in a large German population. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:1358-1362.
- 361 Melen E, Bruce S, Doekes G, Kabesch M, Laitinen T, Lauener R, Lindgren CM, Riedler J, Scheynius A, Hage-Hamsten M, Kere J, Pershagen G, Wickman M, Nyberg F. Haplotypes of G protein-coupled receptor 154 are associated with childhood allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:1089-1095.
- 362 Shin HD, Park KS, Park CS. Lack of association of GPRA (G protein-coupled receptor for asthma susceptibility) haplotypes with high serum IgE or asthma in a Korean population. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1226-1227.
- 363 Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996; 380:630-633.

- 364 Gao PS, Mao XQ, Roberts MH, Arinobu Y, Akaiwa M, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Sasaki S, Hamasaki N, Izuhara K, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J Med Genet* 2000; 37:380-382.
- 365 Gao PS, Heller NM, Walker W, Chen CH, Moller M, Plunkett B, Roberts MH, Schleimer RP, Hopkin JM, Huang SK. Variation in dinucleotide (GT) repeat sequence in the first exon of the STAT6 gene is associated with atopic asthma and differentially regulates the promoter activity in vitro. *J Med Genet* 2004; 41:535-539.
- 366 Tamura K, Arakawa H, Suzuki M, Kobayashi Y, Mochizuki H, Kato M, Tokuyama K, Morikawa A. Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1509-1514.
- 367 Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A. Linkage and association studies of STAT6 gene polymorphisms and allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131:33-38.
- 368 Pykalainen M, Kinos R, Valkonen S, Rydman P, Kilpelainen M, Laitinen LA, Karjalainen J, Nieminen M, Hurme M, Kere J, Laitinen T, Lahesmaa R. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:80-87.
- 369 Schedel M, Carr D, Klopp N, Woitsch B, Illig T, Stachel D, Schmid I, Fritzscher C, Weiland SK, von Mutius E, Kabesch M. A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1100-1105.
- 370 Weidinger S, Klopp N, Wagenpfeil S, Rummeler L, Schedel M, Kabesch M, Schafer T, Darsow U, Jakob T, Behrendt H, Wichmann HE, Ring J, Illig T. Association of a STAT 6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults. *J Med Genet* 2004; 41:658-663.
- 371 Blakey J, Halapi E, Bjornsdottir US, Wheatley A, Kristinsson S, Upmanyu R, Stefansson K, Hakonarson H, Hall IP. Contribution of ADAM33 polymorphisms to the population risk of asthma. *Thorax* 2005; 60:274-276.

- 372 Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH, Zheng SL, Meyers DA, Bleecker ER, Postma DS. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:757-760.
- 373 Lee JH, Park HS, Park SW, Jang AS, Uh ST, Rhim T, Park CS, Hong SJ, Holgate ST, Holloway JW, Shin HD. ADAM33 polymorphism: association with bronchial hyper-responsiveness in Korean asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:860-865.
- 374 Simpson A, Maniatis N, Jury F, Cakebread JA, Lowe LA, Holgate ST, Woodcock A, Ollier WE, Collins A, Custovic A, Holloway JW, John SL. Polymorphisms in a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) predict impaired early-life lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:55-60.
- 375 van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Schouten JP, Boezen HM. A disintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:329-333.
- 376 Werner M, Herbon N, Gohlke H, Altmuller J, Knapp M, Heinrich J, Wjst M. Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:26-31.
- 377 Holgate ST, Davies DE, Powell RM, Holloway JW. ADAM33: a newly identified protease involved in airway remodelling. *Pulm Pharmacol Ther* 2006; 19:3-11.
- 378 Raby BA, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Lange C, Lazarus R, Weiss ST. ADAM33 polymorphisms and phenotype associations in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1071-1078.
- 379 Schedel M, Depner M, Schoen C, Weiland SK, Vogelberg C, Niggemann B, Lau S, Illig T, Klopp N, Wahn U, von ME, Nickel R, Kabesch M. The role of polymorphisms in ADAM33, a disintegrin and metalloprotease 33, in childhood asthma and lung function in two German populations. *Respir Res* 2006; 7:91.
- 380 Howard TD, Postma DS, Jongepier H, Moore WC, Koppelman GH, Zheng SL, Xu J, Bleecker ER, Meyers DA. Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:717-722.

- 381 Shapiro SD, Owen CA. ADAM-33 surfaces as an asthma gene. *N Engl J Med* 2002; 347:936-938.
- 382 Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, Kuldaneck S, Donfack J, Kogut P, Patel NM, Goodenbour J, Howard T, Wolf R, Koppelman GH, White SR, Parry R, Postma DS, Meyers D, Bleecker ER, Hunt JS, Solway J, Ober C. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet* 2005; 76:349-357.
- 383 Chu W, Fant ME, Geraghty DE, Hunt JS. Soluble HLA-G in human placentas: synthesis in trophoblasts and interferon-gamma-activated macrophages but not placental fibroblasts. *Hum Immunol* 1998; 59:435-442.
- 384 Hvid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2005; 12(3):209-32.
- 385 Feger U, Tolosa E, Huang YH, Waschbisch A, Biedermann T, Melms A, Wiendl H. HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood* 2007; 110:568-577.
- 386 Rizzo R, Hviid TV, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L, Baricordi OR. The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs. *Immunogenetics* 2005; 57:172-181.
- 387 Rizzo R, Mapp CE, Melchiorri L, Maestrelli P, Visentin A, Ferretti S, Bononi I, Miotto D, Baricordi OR. Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:508-513.
- 388 Temple R, Allen E, Fordham J, Phipps S, Schneider HC, Lindauer K, Hayes I, Lockey J, Pollock K, Jupp R. Microarray analysis of eosinophils reveals a number of candidate survival and apoptosis genes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:425-433.
- 389 Laprise C, Sladek R, Ponton A, Bernier MC, Hudson TJ, Laviolette M. Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics* 2004; 5:21.
- 390 Hansel NN, Hilmer SC, Georas SN, Cope LM, Guo J, Irizarry RA, Diette GB. Oligonucleotide-microarray analysis of peripheral-blood lymphocytes in severe asthma. *J Lab Clin Med* 2005; 145:263-274.

- 391 Guajardo JR, Schleifer KW, Daines MO, Ruddy RM, Aronow BJ, Wills-Karp M, Hershey GK. Altered gene expression profiles in nasal respiratory epithelium reflect stable versus acute childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:243-251.
- 392 Lilly CM, Tateno H, Oguma T, Israel E, Sonna LA. Effects of allergen challenge on airway epithelial cell gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:579-586.
- 393 Yuyama N, Davies DE, Akaiwa M, Matsui K, Hamasaki Y, Suminami Y, Yoshida NL, Maeda M, Pandit A, Lordan JL, Kamogawa Y, Arima K, Nagumo F, Sugimachi M, Berger A, Richards I, Roberds SL, Yamashita T, Kishi F, Kato H, Arai K, Ohshima K, Tadano J, Hamasaki N, Miyatake S, Sugita Y, Holgate ST, Izuhara K. Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine* 2002; 19:287-296.
- 394 Benson M, Olsson M, Rudemo M, Wennergren G, Cardell LO. Pros and cons of microarray technology in allergy research. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1001-1006.
- 395 D'Ambrosio C, Gatta L, Bonini S. The future of microarray technology: networking the genome search. *Allergy* 2005; 60:1219-1226.
- 396 Kuperman DA, Lewis CC, Woodruff PG, Rodriguez MW, Yang YH, Dolganov GM, Fahy JV, Erle DJ. Dissecting asthma using focused transgenic modeling and functional genomics. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:305-311.
- 397 Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* 2005; 309:1567-1569.
- 398 Mattick JS. The functional genomics of noncoding RNA. *Science* 2005; 309:1527-1528.
- 399 Chen Q, Book M, Fang X, Hoeft A, Stuber F. Screening of copy number polymorphisms in human beta-defensin genes using modified real-time quantitative PCR. *J Immunol Methods* 2006; 308:231-240.
- 400 Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, Harkins MS, Meyers DA, Bleecker ER. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:80-87.
- 401 Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritzsche C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E, Martinez FD. A cluster of seven tightly linked

polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:506-513.

402 Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto R, Arima K, Arinobu Y, Yu B, Kruse S, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Shimazu S, Sasaki S, Adra CN, Kitaichi M, Inoue H, Yamauchi K, Tomichi N, Kurimoto F, Hamasaki N, Hopkin JM, Izuhara K, Shirakawa T, Deichmann KA. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 2000; 9:549-559.

403 Howard TD, Whittaker PA, Zaiman AL, Koppelman GH, Xu J, Hanley MT, Meyers DA, Postma DS, Bleecker ER. Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:377-384.

404 Noguchi E, Nukaga-Nishio Y, Jian Z, Yokouchi Y, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Matsui A, Shibasaki M, Arinami T. Haplotypes of the 5' region of the IL-4 gene and SNPs in the intergene sequence between the IL-4 and IL-13 genes are associated with atopic asthma. *Hum Immunol* 2001; 62:1251-1257.

405 Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, Howard TD, Hoki DM, Daniel R, Newman DL, Wu X, Parry R, Lester LA, Solway J, Blumenthal M, King RA, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER, Cox NJ. Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* 2000; 66:517-526.

406 Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, Fitzgerald JM, Behbehani NA, Tan WC, Pare PD. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:135-140.

407 Suzuki I, Hizawa N, Yamaguchi E, Kawakami Y. Association between a C+33T polymorphism in the IL-4 promoter region and total serum IgE levels. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1746-1749.

408 van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeijs LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, Bakker A, Verweij CL, Aarden LA, van der Zee JS. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun* 1999; 1:61-65.

- 409 Zhu S, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, Watson WT, Pare PD, Sandford AJ. Polymorphisms of the IL-4, TNF-alpha, and Fcepsilon R1beta genes and the risk of allergic disorders in at-risk infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1655-1659.
- 410 Corry DB, Kheradmand F. Biology and therapeutic potential of the interleukin-4/interleukin-13 signaling pathway in asthma. *Am J Respir Med* 2002; 1:185-193.
- 411 Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* 2003; 300:1527-1528.
- 412 Martinez FD, Solomon S, Holberg CJ, Graves PE, Baldini M, Erickson RP. Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1739-1744.
- 413 Xu J, Postma DS, Howard TD, Koppelman GH, Zheng SL, Stine OC, Bleecker ER, Meyers DA. Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1163-1173.
- 414 Arima K, Sato K, Tanaka G, Kanaji S, Terada T, Honjo E, Kuroki R, Matsuo Y, Izuhara K. Characterization of the interaction between interleukin-13 and interleukin-13 receptors. *J Biol Chem* 2005; 280:24915-24922.
- 415 Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T, Dake Y, Shimazu S, Yamashita T, Sugawara N, Brodeur S, Geha R, Puri RK, Sayegh MH, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM, Shirakawa T, Izuhara K. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:980-987.
- 416 Hunninghake GM, Soto-Quiros ME, Avila L, Su J, Murphy A, Demeo DL, Ly NP, Liang C, Sylvia JS, Klanderman BJ, Lange C, Raby BA, Silverman EK, Celedon JC. Polymorphisms in IL13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:84-90.
- 417 Nagarkatti R, Kumar R, Sharma SK, Ghosh B. Association of IL4 gene polymorphisms with asthma in North Indians. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134:206-212.
- 418 Walley AJ, Cookson WO. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet* 1996; 33:689-692.

- 419 Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today* 2000; 21:60-64.
- 420 Faffe DS, Whitehead T, Moore PE, Baraldo S, Flynt L, Bourgeois K, Panettieri RA, Shore SA. IL-13 and IL-4 promote TARC release in human airway smooth muscle cells: role of IL-4 receptor genotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285:L907-L914.
- 421 Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM, Izuhara K. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *J Immunol* 1999; 162:1227-1231.
- 422 Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, Fallin MD, Kao WH, Wahn U, Nickel R. Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:382-388.
- 423 Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K, Imoto N, Nakahara S, Matsui A, Hamaguchi H. No association between atopy/asthma and the IL-4 receptor polymorphism of IL-4 receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:342-345.
- 424 Korzycka-Zaborowska B, Hopkin JM, Gorski P. Genetic variants of Fc epsilon R1 beta and IL-4 and atopy in a Polish population. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2004; 32:53-58.
- 425 Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Moffatt MF, Goldblatt J, Burton PR, Cookson WO, Lesouef PN. Association of Fc epsilon R1 beta polymorphisms with asthma and associated traits in Australian asthmatic families. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1555-1562.
- 426 Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Kawai M, Morimoto K, Hopkin JM. Association between Fc epsilon R1 beta and atopic disorder in a Japanese population. *Lancet* 1996; 347:394-395.
- 427 Zhang X, Zhang W, Qiu D, Sandford A, Tan WC. The E237G polymorphism of the high-affinity IgE receptor beta chain and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93:499-503.

- 428 Aynacioglu AS, Nacak M, Filiz A, Ekinçi E, Roots I. Protective role of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Val105Val genotype in patients with bronchial asthma. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57:213-217.
- 429 Fryer AA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC, Spiteri MA. Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1437-1442.
- 430 Lee YL, Hsiue TR, Lee YC, Lin YC, Guo YL. The association between glutathione S-transferase P1, M1 polymorphisms and asthma in Taiwanese schoolchildren. *Chest* 2005; 128:1156-1162.
- 431 Lee YL, Lin YC, Lee YC, Wang JY, Hsiue TR, Guo YL. Glutathione S-transferase P1 gene polymorphism and air pollution as interactive risk factors for childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1707-1713.
- 432 Child F, Lenney W, Clayton S, Davies S, Jones PW, Alldersea JE, Strange RC, Fryer AA. The association of maternal but not paternal genetic variation in GSTP1 with asthma phenotypes in children. *Respir Med* 2003; 97:1247-1256.
- 433 Hill MR, James AL, Faux JA, Ryan G, Hopkin JM, le Souef P, Musk AW, Cookson WO. Fc epsilon RI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *BMJ* 1995; 311:776-779.
- 434 Moffatt MF, Sharp PA, Faux JA, Young RP, Cookson WO, Hopkin JM. Factors confounding genetic linkage between atopy and chromosome 11q. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:1046-1051.
- 435 Brasch-Andersen C, Christiansen L, Tan Q, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA. Possible gene dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Hum Mutat* 2004; 24:208-214.
- 436 Tamer L, Calikoglu M, Ates NA, Yildirim H, Ercan B, Saritas E, Unlu A, Atik U. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. *Respirology* 2004; 9:493-498.
- 437 Lenney W, Fryer AA. The genetics of asthma: are the glutathione S-transferases serious players? *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1124-1126.

- 438 Moffatt MF, James A, Ryan G, Musk AW, Cookson WO. Extended tumour necrosis factor/HLA-DR haplotypes and asthma in an Australian population sample. *Thorax* 1999; 54:757-761.
- 439 Randolph AG, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, Weiss ST. Extended haplotype in the tumor necrosis factor gene cluster is associated with asthma and asthma-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:687-692.
- 440 Chang HS, Kim JS, Lee JH, Cho JI, Rhim TY, Uh ST, Park BL, Chung IY, Park CS, Shin HD. A single nucleotide polymorphism on the promoter of eotaxin1 associates with its mRNA expression and asthma phenotypes. *J Immunol* 2005; 174:1525-1531.
- 441 Fukunaga K, Asano K, Mao XQ, Gao PS, Roberts MH, Oguma T, Shiomi T, Kanazawa M, Adra CN, Shirakawa T, Hopkin JM, Yamaguchi K. Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics. *Eur Respir J* 2001; 17:59-63.
- 442 Min JW, Lee JH, Park CS, Chang HS, Rhim TY, Park SW, Jang AS, Shin HD. Association of eotaxin-2 gene polymorphisms with plasma eotaxin-2 concentration. *J Hum Genet* 2005; 50:118-123.
- 443 Park SW, Kim dJ, Chang HS, Park SJ, Lee YM, Park JS, Chung IY, Lee JH, Park CS. Association of interleukin-5 and eotaxin with acute exacerbation of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131:283-290.
- 444 Pang L, Nie M, Corbett L, Sutcliffe A, Knox AJ. Mast cell beta-tryptase selectively cleaves eotaxin and RANTES and abrogates their eosinophil chemotactic activities. *J Immunol* 2006; 176:3788-3795.
- 445 Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, Hudson TJ. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:967-973.
- 446 Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, Lake S, Lange C, Wjst M, Weiss ST. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:1057-1065.
- 447 Vollmert C, Illig T, Altmuller J, Klugbauer S, Loesgen S, Dumitrescu L, Wjst M. Single nucleotide polymorphism screening and association analysis--exclusion of integrin beta 7

and vitamin D receptor (chromosome 12q) as candidate genes for asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1841-1850.

- 448 Wjst M. Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. *BMC Genet* 2005; 6:2.
- 449 Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von BA, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SA, Wong KC, Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, von ME, Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WO. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 2007; 448:470-473.
- 450 Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, Herrero E, Balcells S, Gonzalez-Duarte R. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol* 2002; 3:RESEARCH0027.
- 451 Li H, Romieu I, Sienna-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Estela DR-N, Kistner EO, Gjessing HK, Lara-Sanchez IC, Chiu GY, London SJ. Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:119-126.
- 452 Mak JC, Leung HC, Ho SP, Law BK, Ho AS, Lam WK, Ip MS, Chan-Yeung MM. Analysis of TGF-beta(1) gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:92-96.
- 453 Hatsushika K, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Kanzaki M, Takano S, Doi S, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Sagara H, Fukuda T, Masuyama K, Katoh R, Matsumoto K, Saito H, Ogawa H, Tamari M, Nakao A. Transforming growth factor-beta(2) polymorphisms are associated with childhood atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1165-1174.
- 454 Barnes KC, Grant A, Gao P, Baltadjieva D, Berg T, Chi P, Zhang S, Zambelli-Weiner A, Ehrlich E, Zardkoohi O, Brummet ME, Stockton M, Watkins T, Gao L, Gittens M, Wills-Karp M, Cheadle C, Beck LA, Beaty TH, Becker KG, Garcia JG, Mathias RA. Polymorphisms in the novel gene acyloxyacyl hydroxylase (AOAH) are associated with asthma and associated phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:70-77.
- 455 Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A,

Munro CS, El HB, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38:441-446.

456 Turner SW, Khoo SK, Laing IA, Palmer LJ, Gibson NA, Rye P, Landau LI, Goldblatt J, le Souef PN. beta2 adrenoceptor Arg16Gly polymorphism, airway responsiveness, lung function and asthma in infants and children. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1043-1048.

457 Wilson NM, Lamprill JR, Mak JC, Clarke JR, Bush A, Silverman M. Symptoms, lung function, and beta2-adrenoceptor polymorphisms in a birth cohort followed for 10 years. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38:75-81.

458 Zhang G, Hayden CM, Khoo SK, Laing IA, Turner S, Landau L, Goldblatt J, le Souef PN. Association of haplotypes of beta2-adrenoceptor polymorphisms with lung function and airway responsiveness in a pediatric cohort. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41:1233-1241.

459 Ober C, Tan Z, Sun Y, Possick JD, Pan L, Nicolae R, Radford S, Parry RR, Heinzmann A, Deichmann KA, Lester LA, Gern JE, Lemanske RF, Jr., Nicolae DL, Elias JA, Chupp GL. Effect of Variation in CHI3L1 on Serum YKL-40 Level, Risk of Asthma, and Lung Function. *N Engl J Med* 2008; 358:1682-91.

460 Vercelli D, Martinez FD. The Faustian bargain of genetic association studies: bigger might not be better, or at least it might not be good enough. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1303-1305.

461 Leynaert B, Guilleud-Bataille M, Soussan D, Benessiano J, Guenegou A, Pin I, Neukirch F. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:658-665.

462 Fageras BM, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, Jenmalm MC, Mai XM, Nilsson L, Zdolsek HA, Bjorksten B, Soderkvist P, Vaarala O. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:561-567.

463 Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, Fallin MD, Kao WH, Wahn U, Nickel R. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:489-495.

- 464 Chan IH, Leung TF, Tang NL, Li CY, Sung YM, Wong GW, Wong CK, Lam CW. Gene-gene interactions for asthma and plasma total IgE concentration in Chinese children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:127-133.
- 465 Castile RG. Pulmonary function testing in children. In: Chernick V, Boat TF, Kendig EL, editors. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*. Philadelphia: Saunders, 1998: 196-214.
- 466 Stocks J, Lum S. Applications and Future directions of infant pulmonary function testing. In: Hammer J, Eber E, editors. *Paediatric Pulmonary Function Testing*. Karger, 2005: 78-93.
- 467 Dezateux C, Wade AM, Schmalisch G et al. Maximizing effective research in infant respiratory function. In: Stocks J, Sly PD, Tepper RS et al, editors. *Infant Respiratory Function Testing*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996: 521-550.
- 468 Frey U. Clinical applications of infant lung function testing: does it contribute to clinical decision making? *Paediatr Respir Rev* 2001; 2:126-130.
- 469 Schibler A, Frey U. Role of lung function testing in the management of mechanically ventilated infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002; 87:F7-F10.
- 470 Colin AA. Infant pulmonary testing - techniques, physiological perspectives and clinical applications. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5 Suppl A:S73-S76.
- 471 Davis SD. Neonatal and pediatric respiratory diagnostics. *Respir Care* 2003; 48:367-384.
- 472 Godfrey S, Bar-Yishay E, Avital A, Springer C. What is the role of tests of lung function in the management of infants with lung disease? *Pediatr Pulmonol* 2003; 36:1-9.
- 473 Hanrahan J, Silverman M, Tepper R. Clinical epidemiology and future directions. In: Stocks J, Sly PD, Tepper RS et al, editors. *Infant Respiratory Function Testing*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996: 551-562.
- 474 Haland G, Carlsen KH, Devulapalli CS, Pettersen M, Mowinckel P, Lodrup Carlsen KC. Lung function development in the first 2 yr of life is independent of allergic diseases by 2 yr. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18:528-534.

- 475 Johnston ID, Strachan DP, Anderson HR. Effect of pneumonia and whooping cough in childhood on adult lung function. *N Engl J Med* 1998; 338:581-587.
- 476 Oswald H, Phelan PD, Lanigan A, Hibbert M, Carlin JB, Bowes G, Olinsky A. Childhood asthma and lung function in mid-adult life. *Pediatr Pulmonol* 1997; 23:14-20.
- 477 Turner SW, Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Judge PK, Cox M, Young S, Goldblatt J, Landau LI, le Souef PN. The relationship between infant airway function, childhood airway responsiveness, and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:921-927.
- 478 Hibbert ME, Lannigan A, Landau LI, Phelan PD. Lung function values from a longitudinal study of healthy children and adolescents. *Pediatr Pulmonol* 1989; 7:101-109.
- 479 Clarke JR, Salmon B, Silverman M. Bronchial responsiveness in the neonatal period as a risk factor for wheezing in infancy. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1434-1440.
- 480 Murray CS, Pipis SD, McArdle EC, Lowe LA, Custovic A, Woodcock A. 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.
- 481 Young S, Arnott J, O'Keeffe PT, Le Souëf PN, Landau LI. The association between early life lung function and wheezing during the first 2 years of life. *Eur Respir J* 2000; 15:151-157.
- 482 Yuksel B, Greenough A, Giffin F, Nicolaidis KH. Tidal breathing parameters in the first week of life and subsequent cough and wheeze. *Thorax* 1996; 51:815-818.
- 483 Helms P, Beardsmore CS, Stocks J. Absolute intraesophageal pressure at functional residual capacity in frequency. *J Appl Physiol* 1981; 51:270-275.
- 484 Allen JL, Sivan Y. Measurements of Chest Wall Function. In: Stocks J, Sly PD, Tepper RS et al, editors. *Infant Respiratory Function Testing*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996: 329-355.
- 485 Muller NL, Bryan AC. Chest wall mechanics and respiratory muscles in infants. *Pediatr Clin North Am* 1979; 26:503-516.
- 486 Traeger N, Panitch HB. Tests of respiratory muscle strength in neonates. *Neo Reviews* 2004; 5:208-214.

- 487 Infant Respiratory Function Testing. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996.
- 488 Stocks J, Hislop A. Structure and function of the respiratory system: Development aspects and their relevance to aerosol therapy. In: Bisgaard H, O'Callaghan C, Smaldone A, editors. Drug Delivery to the lung. New York: Marcel Dekker Inc, 2001: 47-104.
- 489 Gaultier C, Fletcher ME, Beardsmore C, England S, Motoyama E. Respiratory function measurements in infants: measurement conditions. Working Group of the European Respiratory Society and the American Thoracic Society. *Eur Respir J* 1995; 8:1057-1066.
- 490 Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N Engl J Med* 1988; 319:1112-1117.
- 491 Stocks J, Henschen M, Hoo AF, Costeloe K, Dezateux C. Influence of ethnicity and gender on airway function in preterm infants. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1855-1862.
- 492 Morris MJ, Lane DJ. Tidal expiratory flow patterns in airflow obstruction. *Thorax* 1981; 36:135-142.
- 493 Kaye R, Whittenberger JL, Silverman L. Respiratory air flow patterns in children. *Am J Dis Child* 1949; 77:641.
- 494 Clarke JR, Aston H, Silverman M. Evaluation of a tidal expiratory flow index in healthy and diseased infants. *Pediatr Pulmonol* 1994; 17:285-290.
- 495 Adler A, Tager IB, Brown RW, Ngo L, Hanrahan JP. Relationship between an index of tidal flow and lower respiratory illness in the first year of life. *Pediatr Pulmonol* 1995; 20:137-144.
- 496 Lodrup Carlsen KC, Jaakkola JJ, Nafstad P, Carlsen KH. In utero exposure to cigarette smoking influences lung function at birth. *Eur Respir J* 1997; 10:1774-1779.
- 497 Stick SM, Burton PR, Gurrin L, Sly PD, Lesouef PN. Effects of maternal smoking during pregnancy and a family history of asthma on respiratory function in newborn infants. *Lancet* 1996; 348:1060-1064.

- 498 Haland G, Carlsen KC, Sandvik L, Devulapalli CS, Munthe-Kaas MC, Pettersen M, Carlsen KH. Reduced lung function at birth and the risk of asthma at 10 years of age. *N Engl J Med* 2006; 355:1682-1689.
- 499 Darling RC, Cournand A, Richards DW. Studies on the intrapulmonary mixture of gases: III. An open circuit method for measuring residual air. *J Clin Invest* 1940; 19:609-618.
- 500 Gerhardt T, Hehre D, Bancalari E, Watson H. A simple method for measuring functional residual capacity by N₂ washout in small animals and newborn infants. *Pediatr Res* 1985; 19:1165-1169.
- 501 Morris MG, Gustafsson P, Tepper R, Gappa M, Stocks J. The bias flow nitrogen washout technique for measuring the functional residual capacity in infants. ERS/ATS Task Force on Standards for Infant Respiratory Function Testing. *Eur Respir J* 2001; 17:529-536.
- 502 Ronchetti R, Stocks J, Keith I, Godfrey S. An analysis of a rebreathing method for measuring lung volume in the premature infant. *Pediatr Res* 1975; 9:797-802.
- 503 Sivan Y, Deakers TW, Newth CJ. Functional residual capacity in ventilated infants and children. *Pediatr Res* 1990; 28:451-454.
- 504 Strang LB, Mcgrath MW. Alveolar ventilation in normal newborn infants studied by air wash-in after oxygen breathing. *Clin Sci* 1962; 23:129-139.
- 505 Gustafsson PM, Ljungberg HK, Kjellman B. Peripheral airway involvement in asthma assessed by single-breath SF₆ and He washout. *Eur Respir J* 2003; 21:1033-1039.
- 506 Gustafsson PM, Aurora P, Lindblad A. Evaluation of ventilation maldistribution as an early indicator of lung disease in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2003; 22:972-979.
- 507 Ljungberg H, Hulskamp G, Hoo AF, Lum S, Pillow JJ, Aurora P, Gustafsson P, Stocks J. Abnormal lung clearance index (LCI) is more common than reduced FEV_{0.5} in infants with CF. 2003: A41.
- 508 Stocks J, Marchal F, Kraemer R et al. Plethysmographic assessment of functional residual capacity and airway resistance. In: Stocks J, Sly PD, Tepper RS et al, editors. *Infant Respiratory Function Testing*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996: 190-240.

- 509 Coates AL, Peslin R, Rodenstein D, Stocks J. Measurement of lung volumes by plethysmography. *Eur Respir J* 1997; 10:1415-1427.
- 510 Coates AL, Stocks J, Gerhardt T. Esophageal Manometry. In: Stocks J, Sly PD, Tepper RS et al, editors. *Infant Respiratory Function Testing*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996: 241-258.
- 511 Bisgaard H, Klug B. Lung function measurement in awake young children. *Eur Respir J* 1995; 8:2067-2075.
- 512 Delacourt C, Lorino H, Herve-Guillot M, Reinert P, Harf A, Housset B. Use of the forced oscillation technique to assess airway obstruction and reversibility in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:730-736.
- 513 Desager KN, Cauberghs M, Naudts J, Van De Woestijne KP. Influence of upper airway shunt on total respiratory impedance in infants. *J Appl Physiol* 1999; 87:902-909.
- 514 Marchal F, Colin G, Chalon C, Duvivier C, Crance JP, Peslin R. Transfer respiratory impedance and thoracic gas volume to estimate airway and tissue impedance in infants. *Eur Resp Rev* 1994; 4:159-164.
- 515 Sly PD, Hayden MJ, Pet k F, Hantos Z. Measurement of low-frequency respiratory impedance in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:161-166.
- 516 Desager KN, Marchal F, Van De Woestijne KP. Forced Oscillation Techniques. In: Stocks J, Sly PD, Tepper RS et al, editors. *Infant Respiratory Function Testing*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996: 355-378.
- 517 Frey U, Silverman M, Kraemer R, Jackson AC. High-frequency respiratory input impedance measurements in infants assessed by the high speed interrupter technique. *Eur Respir J* 1998; 12:148-158.
- 518 Motoyama EK. Pulmonary mechanics during early postnatal years. *Pediatr Res* 1977; 11:220-223.
- 519 Frey U, Jackson AC, Silverman M. Differences in airway wall compliance as a possible mechanism for wheezing disorders in infants. *Eur Respir J* 1998; 12:136-142.

- 520 Frey U, Makkonen K, Wellman T, Beardsmore C, Silverman M. Alterations in airway wall properties in infants with a history of wheezing disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1825-1829.
- 521 Olinsky A, Bryan AC, Bryan MH. A simple method of measuring total respiratory system compliance in newborn infants. *S Afr Med J* 1976; 50:128-130.
- 522 Fletcher ME, Baraldi E, Steinbrugger B. Passive Respiratory Mechanics. In: Stocks J, Sly PD, Tepper RS et al, editors. *Infant Respiratory Function Testing*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996: 283-328.
- 523 Stocks J, Nothen U, Sutherland P, Hatch DJ, Helms P. Improved accuracy of the occlusion technique for assessing total respiratory compliance in infants. *Pediatr Pulmonol* 1987; 3:71-77.
- 524 Mortola JP, Fisher JT, Smith B, Fox G, Weeks S. Dynamics of breathing in infants. *J Appl Physiol* 1982; 52:1209-1215.
- 525 Thomson AH, Beardsmore CS, Silverman M. The total compliance of the respiratory system during the first year of life. *Bull Eur Physiopath Resp* 1985; 21:411-416.
- 526 Le Souëf PN, England SJ, Bryan AC. Passive respiratory mechanics in newborns and children. *Am Rev Resp Dis* 1984; 129:552-556.
- 527 Lui K, Lloyd J, Ang E, Rynn M, Gupta JM. Early changes in respiratory compliance and resistance during the development of bronchopulmonary dysplasia in the era of surfactant therapy. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30:282-290.
- 528 Tortorolo L, Vento G, Matassa PG, Zecca E, Romagnoli C. Early changes of pulmonary mechanics to predict the severity of bronchopulmonary dysplasia in ventilated preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002; 12:332-337.
- 529 Stenson BJ, Glover RM, Wilkie RA, Laing IA, Tarnow-Mordi WO. Randomised controlled trial of respiratory system compliance measurements in mechanically ventilated neonates. *Arch Dis Child* 1998; 78:F15-F19.
- 530 Manczur TI, Greenough A, Pryor D, Rafferty GF. Assessment of respiratory drive and muscle function in the pediatric intensive care unit and prediction of extubation failure. *Pediatr Crit Care Med* 2000; 1:124-126.

- 531 Pride NB, Permutt S, Riley RL, Bromberger-Barnea B. Determinants of maximal expiratory flow from the lungs. *J Appl Physiol* 1967; 23:646-662.
- 532 Pride NB. The assessment of airflow obstruction. Role of measurements of airways resistance and of tests of forced expiration. *Br J Dis Chest* 1971; 65:135-169.
- 533 Sly PD, Flack FS. Lung Function. In: Silverman E, editor. *Childhood asthma and other wheezing disorders*. London: Arnold, 2002: 125-143.
- 534 Mead J, Turner JM, Macklem PT, Little JB. Significance of the relationship between lung recoil and maximum expiratory flow. *J Appl Physiol* 1967; 22:95-108.
- 535 Permutt S, Bromberg-Barnea B, Bane NH. Alveolar pressure, pulmonary venous pressure and the vascular waterfall. *Med Thorac* 1962; 19:239-260.
- 536 Dawson SV, Elliott EA. Wave-speed limitation on expiratory flow-a unifying concept. *J Appl Physiol* 1977; 43:498-515.
- 537 Taussig LM, Landau LI, Godfrey S, Arad I. Determinants of forced expiratory flows in newborn infants. *J Appl Physiol* 1982; 53:1220-1227.
- 538 Tepper RS, Morgan WJ, Cota K, Wright A, Taussig LM, The Group Health Medical Associates' Pediatricians. Physiologic growth and development of the lung during the first year of life. *Am Rev Resp Dis* 1986; 134:513-519.
- 539 Le Souëf PN, Castile R, Motoyama E et al. Forced Expiratory Maneuvers. In: Stocks J, Sly PD, Tepper RS et al, editors. *Infant Respiratory Function Testing*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996: 379-410.
- 540 Allen J, Gappa M. The raised volume rapid thoracoabdominal compression technique. The Joint American Thoracic Society/European Respiratory Society Working Group on Infant Lung Function. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1760-1762.
- 541 Lacourt G, Polgar G. Interaction between nasal and pulmonary resistance in newborn infants. *J Appl Physiol* 1971; 30:870-873.
- 542 Stocks J, Godfrey S, Reynolds EO. Airway resistance in infants after various treatments for hyaline membrane disease: special emphasis on prolonged high levels of inspired oxygen. *Pediatrics* 1978; 61:178-183.

- 543 Morgan WJ, Geller DE, Tepper RS, Taussig LM. Partial expiratory flow-volume curves in infants and young children. *Pediatr Pulmonol* 1988; 5:232-243.
- 544 Tepper RS, Reister T. Forced expiratory flows and lung volumes in normal infants. *Pediatr Pulmonol* 1993; 15:357-361.
- 545 Turner DJ, Stick SM, Lesouef KL, Sly PD, Lesouef PN. A new technique to generate and assess forced expiration from raised lung volume in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1441-1450.
- 546 Le Souëf PN, Hughes DM, Landau LI. Shape of forced expiratory flow-volume curves in infants. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:590-597.
- 547 Sly PD, Tepper R, Henschen M, Gappa M, Stocks J. Tidal forced expirations. ERS/ATS Task Force on Standards for Infant Respiratory Function Testing. European Respiratory Society/American Thoracic Society. *Eur Respir J* 2000; 16:741-748.
- 548 Stark AR, Cohan BA, Waggener TB, Frantz IDI, Kosch PC. Regulation of end-expiratory lung volume during sleep in premature infants. *J Appl Physiol* 1987; 62:1117-1123.
- 549 Stick SM, Arnott J, Turner DJ, Young S, Landau LI, Lesouef PN. Bronchial responsiveness and lung function in recurrently wheezy infants. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1012-1015.
- 550 Davis S, Jones M, Kisling J, Angelicchio C, Tepper RS. Effect of continuous positive airway pressure on forced expiratory flows in infants with tracheomalacia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:148-152.
- 551 Hartmann H, Seidenberg J, Noyes JP, O'Brien L, Poets CF, Samuels MP, Southall DP. Small airway patency in infants with apparent life-threatening events. *Eur J Pediatr* 1998; 157:71-74.
- 552 Ranganathan SC, Goetz I, Hoo AF, Lum S, Castle R, Stocks J. Assessment of tidal breathing parameters in infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2003; 22:761-766.
- 553 Ranganathan SC, Stocks J, Dezateux C, Bush A, Wade A, Carr S, Castle R, Dinwiddie R, Hoo AF, Lum S, Price J, Stroobant J, Wallis C. The evolution of airway function in early childhood following clinical diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:928-933.

- 554 Tager IB, Hanrahan JP, Tosteson TD, Castile RG, Brown RW, Weiss ST, Speizer FE. Lung function, pre- and post-natal smoke exposure, and wheezing in the first year of life. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:811-817.
- 555 Delacourt C, Benoist MR, Waernessyckle S, Rufin P, Brouard JJ, de BJ, Scheinmann P. Relationship between bronchial responsiveness and clinical evolution in infants who wheeze: a four-year prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1382-1386.
- 556 Klaus M, Tooley WH, Weaver KH, Clements JA. Functional residual capacity in newborn infants measured by a rapid physical method. *Am J Dis Child* 1960; 100:482-484.
- 557 Polgar G. Airway resistance in the newborn infant. *J Pediatr* 1961; 59:915-921.
- 558 Radford M. Measurement of airway resistance and thoracic gas volume in infancy. *Arch Dis Child* 1974; 49:611-615.
- 559 Jones MH, Howard J, Davis S, Kisling J, Tepper RS. Sensitivity of spirometric measurements to detect airway obstruction in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1283-1286.
- 560 Ranganathan SC, Bush A, Dezateux C, Carr SB, Hoo AF, Lum S, Madge S, Price J, Stroobant J, Wade A, Wallis C, Wyatt H, Stocks J. Relative ability of full and partial forced expiratory maneuvers to identify diminished airway function in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1350-1357.
- 561 Mallol J, Aguirre VL, Wandalsen G. Variability of the raised volume rapid thoracic compression technique in infants with recurrent wheezing. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2005; 33:74-79.
- 562 Modl M, Eber E, Weinhandl E, Gruber W, Zach MS. Assessment of bronchodilator responsiveness in infants with bronchiolitis. A comparison of the tidal and the raised volume rapid thoracoabdominal compression technique. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:763-768.
- 563 Turner DJ, Lanteri CJ, Le Souëf PN, Sly PD. Improved detection of abnormal respiratory function using forced expiration from raised lung volume in infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1994; 7:1995-1999.

- 564 Wildhaber JH, Dore ND, Devadason SG, Hall GL, Hamacher J, Arheden L, Lesouef PN. Comparison of subjective and objective measures in recurrently wheezy infants. *Respiration* 2002; 69:397-405.
- 565 Goldstein AB, Castile RG, Davis SD, Filbrun DA, Flucke RL, McCoy KS, Tepper RS. Bronchodilator responsiveness in normal infants and young children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:447-454.
- 566 Saito J, Harris WT, Gelfond J, Noah TL, Leigh MW, Johnson R, Davis SD. Physiologic, bronchoscopic, and bronchoalveolar lavage fluid findings in young children with recurrent wheeze and cough. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41:709-719.
- 567 ATS/ERS statement: raised volume forced expirations in infants: guidelines for current practice. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1463-1471.
- 568 Lum S, Hulskamp G, Hoo AF, Ljungberg H, Stocks J. Effect of raised lung volume technique on subsequent measures of V_{max}FRC in infants. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38:146-154.
- 569 Ernst P, Ghezzo H, Becklake MR. Risk factors for bronchial hyperresponsiveness in late childhood and early adolescence. *Eur Respir J* 2002; 20:635-639.
- 570 Merkus PJ, Borsboom GJ, Van Pelt W, Schrader PC, Van Houwelingen HC, Kerrebijn KF, Quanjer PH. Growth of airways and air spaces in teenagers is related to sex but not to symptoms. *J Appl Physiol* 1993; 75:2045-2053.
- 571 Covar RA, Spahn JD, Murphy JR, Szeffler SJ. Progression of asthma measured by lung function in the childhood asthma management program. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:234-241.
- 572 Landau LI, Morgan W, McCoy KS, Taussig LM. Gender related differences in airway tone in children. *Pediatr Pulmonol* 1993; 16:31-35.
- 573 Hepper PG, Shannon EA, Dornan JC. Sex differences in fetal mouth movements. *Lancet* 1997; 350:1820.
- 574 Boddy K, Dawes GS. Fetal breathing. *Br Med Bull* 1975; 31:3-7.

- 575 Torday JS, Nielsen HC. The sex difference in fetal lung surfactant production. *Exp Lung Res* 1987; 12:1-19.
- 576 Martin TR, Feldman HA, Fredberg JJ, Castile RG, Mead J, Wohl ME. Relationship between maximal expiratory flows and lung volumes in growing humans. *J Appl Physiol* 1988; 65:822-828.
- 577 Hibbert M, Lannigan A, Raven J, Landau L, Phelan P. Gender differences in lung growth. *Pediatr Pulmonol* 1995; 19:129-134.
- 578 Gerritsen JGH, Koeter GH, Postma DS, Schouten JP, Knol K. Prognosis of asthma from childhood to adulthood. *Am Rev Resp Dis* 1989; 140:1325-1330.
- 579 Rasmussen F, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Greene JM, Herbison GP, Sears MR. Risk factors for airway remodeling in asthma manifested by a low postbronchodilator FEV1/vital capacity ratio: a longitudinal population study from childhood to adulthood. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1480-1488.
- 580 Hoo AF, Henschen M, Dezateux C, Costeloe K, Stocks J. Respiratory function among preterm infants whose mothers smoked during pregnancy. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:700-705.
- 581 Magowan BA, Bain M, Juszczak E, McInnery K. Neonatal mortality amongst Scottish preterm singleton births (1985-1994). *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:1005-1010.
- 582 Divon MY, Guidetti DA, Braverman JJ, Oberlander E, Langer O, Merkatz IR. Intrauterine growth retardation - a prospective study of the diagnostic value of real-time sonography combined with umbilical artery flow velocimetry. *Obstet Gynecol* 1988; 72:611-614.
- 583 Divon MY, Haglund B, Nisell H, Otterblad PO, Westgren M. Fetal and neonatal mortality in the postterm pregnancy: the impact of gestational age and fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:726-731.
- 584 Kramer MS. Intrauterine growth and gestational duration determinants. *Pediatrics* 1987; 80:502-511.
- 585 Blake KV, Gurrin LC, Evans SF, Beilin LJ, Landau LI, Stanley FJ, Newnham JP. Maternal cigarette smoking during pregnancy, low birth weight and subsequent blood pressure in early childhood. *Early Hum Dev* 2000; 57:137-147.

- 586 Walsh RA. Effects of maternal smoking on adverse pregnancy outcomes: examination of the criteria of causation. *Hum Biol* 1994; 66:1059-1092.
- 587 Matsubara F, Kida M, Tamakoshi A, Wakai K, Kawamura T, Ohno Y. Maternal active and passive smoking and fetal growth: A prospective study in Nagoya, Japan. *J Epidemiol* 2000; 10:335-343.
- 588 Lubchenco LO, Horner FA, Reed LH, Hix IE, Jr., Metcalf D, Cohig R, Elliott HC, Bourg M. Sequelae of premature birth. Evaluation of premature infants of low birth weights at ten years of age. *Am J Dis Child* 1963; 106:101-115.
- 589 Levi S, Taylor W, Robinson LE, Levy LI. Analysis of morbidity and outcome of infants weighing less than 800 grams at birth. *South Med J* 1984; 77:975-978.
- 590 McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ. Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med* 1999; 340:1234-1238.
- 591 Vik T, Vatten L, Markestad T, Ahlsten G, Jacobsen G, Bakketeig LS. Morbidity during the first year of life in small for gestational age infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996; 75:F33-F37.
- 592 Strachan DP, Cook DG. Health effects of passive smoking. 1. Parental smoking and lower respiratory illness in infancy and early childhood. *Thorax* 1997; 52:905-914.
- 593 Lewis S, Richards D, Bynner J, Butler N, Britton J. Prospective study of risk factors for early and persistent wheezing in childhood. *Eur Respir J* 1995; 8:349-356.
- 594 Rona RJ, Gulliford MC, Chinn S. Effects of prematurity and intrauterine growth on respiratory health and lung function in childhood. *BMJ* 1993; 306:817-820.
- 595 Luck W, Nau H. Nicotine and cotinine concentrations in serum and urine of infants exposed via passive smoking or milk from smoking mothers. *J Pediatr* 1985; 107:816-820.
- 596 Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P, III, Jones RT, Osman AL. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34:604-611.

- 597 Jarvis MJ, Primatesta P, Erens B, Feyerabend C, Bryant A. Measuring nicotine intake in population surveys: comparability of saliva cotinine and plasma cotinine estimates. *Nicotine Tob Res* 2003; 5:349-355.
- 598 Jarvis MJ, Feyerabend C, Bryant A, Hedges B, Primatesta P. Passive smoking in the home: plasma cotinine concentrations in non-smokers with smoking partners. *Tob Control* 2001; 10:368-374.
- 599 Jarvis MJ, Boreham R, Primatesta P, Feyerabend C, Bryant A. Nicotine yield from machine-smoked cigarettes and nicotine intakes in smokers: evidence from a representative population survey. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:134-138.
- 600 Jarvis MJ, Goddard E, Higgins V, Feyerabend C, Bryant A, Cook DG. Children's exposure to passive smoking in England since the 1980s: cotinine evidence from population surveys. *BMJ* 2000; 321:343-345.
- 601 Jarvis MJ, Russell MA, Benowitz NL, Feyerabend C. Elimination of cotinine from body fluids: implications for noninvasive measurement of tobacco smoke exposure. *Am J Public Health* 1988; 78:696-698.
- 602 McNeill AD, Jarvis MJ, West R, Russell MA, Bryant A. Saliva cotinine as an indicator of cigarette smoking in adolescents. *Br J Addict* 1987; 82:1355-1360.
- 603 Jarvis MJ, Tunstall-Pedoe H, Feyerabend C, Vesey C, Saloojee Y. Comparison of tests used to distinguish smokers from nonsmokers. *Am J Public Health* 1987; 77:1435-1438.
- 604 Collins MH, Moessinger AC, Kleinerman J, Bassi J, Rosso P, Collins AM, James LS, Blanc WA. Fetal lung hypoplasia associated with maternal smoking: a morphometric analysis. *Pediatr Res* 1985; 19:408-412.
- 605 Taylor B, Wadsworth J. Maternal smoking during pregnancy and lower respiratory tract illness in early life. *Arch Dis Child* 1987; 62:786-791.
- 606 Young S, le Souef PN, Geelhoed GC, Stick SM, Turner KJ, Landau LI. The influence of a family history of asthma and parental smoking on airway responsiveness in early infancy. *N Engl J Med* 1991; 324:1168-1173.

- 607 Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Burton PR, Landau LI, Lesouef PN. Airway responsiveness in early infancy predicts asthma, lung function, and respiratory symptoms by school age. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:37-42.
- 608 Clarke J, Silverman M. Infant lung function and tidal breathing patterns. *Pediatr Pulmonol* 1995; 20:135-136.
- 609 Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31:143-178.
- 610 Freeman JV, Cole TJ, Chinn S, Jones PR, White EM, Preece MA. Cross sectional stature and weight reference curves for the UK, 1990. *Arch Dis Child* 1995; 73:17-24.
- 611 Jackson EA, Rabbette PS, Dezateux CA, Hatch DJ, Stocks J. The effect of triclofos sodium sedation on respiratory rate, oxygen saturation and heart rate in infants and young children. *Pediatr Pulmonol* 1991; 10:40-45.
- 612 Rabbette PS, Dezateux CA, Fletcher ME, Costeloe KL, Stocks J. Influence of sedation on the Hering-Breuer Inflation Reflex in healthy infants. *Pediatr Pulmonol* 1991; 11:217-222.
- 613 Adler SM, Wohl MEB. Flow-volume relationship at low lung volumes in healthy term newborn infants. *Pediatrics* 1978; 61:636-640.
- 614 Hoo AF, Dezateux C, Hanrahan JP, Cole TJ, Tepper RS, Stocks J. Sex-specific prediction equations for $V'_{max}FRC$ in infancy: a multicenter collaborative study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1084-1092.
- 615 Castile R, Filbrun D, Flucke R, Franklin W, McCoy K. Adult-type pulmonary function tests in infants without respiratory disease. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30:215-227.
- 616 Jones M, Castile R, Davis S, Kisling J, Filbrun D, Flucke R, Goldstein A, Emsley C, Ambrosius W, Tepper RS. Forced expiratory flows and volumes in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:353-359.

- 617 Modl M, Eber E, Weinhandl E, Gruber W, Zach MS. Reproducibility of forced expiratory flow and volume measurements in infants with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 1999; 28:429-435.
- 618 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- 619 Hayden MJ, Wildhaber JH, Le Souëf PN. Parental attitudes toward infant pulmonary function testing. *Pediatr Pulmonol* 1998; 25:309-313.
- 620 Turner S, Zhang G, Young S, Cox M, Goldblatt J, Landau L, Le Souëf PN. Associations between postnatal weight gain, change in postnatal pulmonary function, formula feeding and early asthma. *Thorax* 2008; 63:234-239.
- 621 Young S, Arnott J, Le Souëf PN, Landau LI. Flow limitation during tidal expiration in symptom-free infants and the subsequent development of asthma. *J Pediatr* 1994; 124:681-688.
- 622 Clarke JR, Reese A, Silverman M. Bronchial responsiveness and lung function in infants with lower respiratory tract illness over the first six months of life. *Arch Dis Child* 1992; 67:1454-1458.
- 623 Beardsmore CS, Page C, Silverman M. The response to beta-agonists in wheezy infants: three methods compared. *Respir Med* 2004; 98:1138-1145.
- 624 Hayden MJ, Wildhaber JH, Le Souëf PN. Bronchodilator responsiveness testing using raised volume forced expiration in recurrently wheezing infants. *Pediatr Pulmonol* 1998; 26:35-41.
- 625 Hofhuis W, van der Wiel EC, Tiddens HA, Brinkhorst G, Holland WP, de Jongste JC, Merkus PJ. Bronchodilation in infants with malacia or recurrent wheeze. *Arch Dis Child* 2003; 88:246-249.
- 626 Hoo AF, Dezateux C, Henschen M, Costeloe K, Stocks J. Development of airway function in infancy after preterm delivery. *J Pediatr* 2002; 141:652-658.
- 627 Hoo AF, Stocks J, Lum S, Wade AM, Castle RA, Costeloe KL, Dezateux C. Development of lung function in early life: influence of birth weight in infants of nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:527-533.

- 628 Hellings PW, Vandenberghe P, Kasran A, Coorevits L, Overbergh L, Mathieu C, Ceuppens JL. Blockade of CTLA-4 enhances allergic sensitization and eosinophilic airway inflammation in genetically predisposed mice. *Eur J Immunol* 2002; 32:585-594.
- 629 Yang YH, Chen MC, Tsai MJ, Lin YT, Chiang BL. Costimulatory molecules expression and cytokine profiles of cord blood mononuclear cells in newborns with low and high risk of developing atopic diseases. *J Microbiol Immunol Infect* 2000; 33:159-164.
- 630 Koning H, Neijens HJ, Baert MR, Oranje AP, Savelkoul HF. T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997; 9:427-436.
- 631 Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Loh R, Holt PG. Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants. *Clin Exp Allergy* 1998; 28 Suppl 5:39-44.
- 632 Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353:196-200.
- 633 Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Sly PD, Holt PG. TH2-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:1261-1269.
- 634 Kjellman NI, Croner S. Cord blood IgE determination for allergy prediction - a follow-up to seven years of age in 1,651 children. *Ann Allergy* 1984; 53:167-171.
- 635 Kondo N, Kobayashi Y, Shinoda S, Takenaka R, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Matsui E, Kasahara K, Yokoyama Y. Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders-6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1340-1344.
- 636 Tang ML, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994; 344:983-985.
- 637 Lange J, Ngoumou G, Berkenheide S, Moseler M, Mattes J, Kuehr J, Kopp MV. High interleukin-13 production by phytohaemagglutinin- and Der p 1-stimulated cord blood mononuclear cells is associated with the subsequent development of atopic dermatitis at the age of 3 years. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1537-1543.

- 638 Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Halonen M. Association of interleukin-2 and interferon-gamma production by blood mononuclear cells in infancy with parental allergy skin tests and with subsequent development of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:652-660.
- 639 Ohshima Y, Yasutomi M, Omata N, Yamada A, Fujisawa K, Kasuga K, Hiraoka M, Mayumi M. Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4+ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res* 2002; 51:195-200.
- 640 Guerra S, Lohman IC, Halonen M, Martinez FD, Wright AL. Reduced interferon gamma production and soluble CD14 levels in early life predict recurrent wheezing by 1 year of age. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:70-76.
- 641 Gabrielsson S, Soderlund A, Nilsson C, Lilja G, Nordlund M, Troye-Blomberg M. Influence of atopic heredity on IL-4-, IL-12- and IFN-gamma-producing cells in in vitro activated cord blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 126:390-396.
- 642 van der Velden V, Laan MP, Baert MR, de Waal Malefyt R, Neijens HJ, Savelkoul HF. Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:997-1006.
- 643 Haddeland U, Sletten GB, Brandtzaeg P, Nakstad B. Impaired interleukin (IL)-4-associated generation of CCR4-expressing T cells in neonates with hereditary allergy risk. *Clin Exp Immunol* 2005; 139:314-322.
- 644 Joshi P, Shaw A, Kakakios A, Isaacs D. Interferon-gamma levels in nasopharyngeal secretions of infants with respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections. *Clin Exp Immunol* 2003; 131:143-147.
- 645 Pala P, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Metcalfe C, Sigurs N, Openshaw PJ. Enhanced IL-4 responses in children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Eur Respir J* 2002; 20:376-382.
- 646 Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, Mandl CW, Rebhandl W, Vollnhofer G, Kundi M, Popow-Kraupp T. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood

mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1263-1268.

647 Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, Geelen SM, van Vught HJ, Kimpen JL. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J* 1999; 14:144-149.

648 Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:633-639.

649 Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Simon V, Escobar AM, Gaggero A, Diaz PV. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:190-195.

650 Renzi PM, Turgeon JP, Marcotte JE, Drblik SP, Berube D, Gagnon MF, Spier S. Reduced interferon-gamma production in infants with bronchiolitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1417-1422.