

HISTÓRIA NATURAL DOS SINTOMAS DE ASMA NA INFÂNCIA:

Fenótipos de Sibilância nos 11 Primeiros Anos de Vida

- *Análise de Fatores de Risco Associados: Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório,
Teste de Desafio à Metacolina, IgE Sérico e Testes Cutâneos Alérgicos –*

RENATO T. STEIN

Porto Alegre

1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PNEUMOLOGIA

ORIENTADORES: FERNANDO ABREU E SILVA (Universidade Federal RGS)

FERNANDO D. MARTINEZ (Universidade do Arizona)



MED
T
WF553 S819h 1998

05189974

[0288829] Stein, Renato Tetelbom. História natural dos sintomas de asma na infância: fenótipos de sibilância nos 11 primeiros anos de vida. 1998. 97 f. : il.

BIBLIOTECA
FARMACIA

AGRADECIMENTOS

À direção da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em especial ao Dr. Carlos César Fritscher na chefia da Pós-Graduação, pelo incentivo e apoio a este projeto ambicioso de desenvolver esta pesquisa nos Estados Unidos.

À direção do Departamento de Pediatria, e a todos os colegas de Departamento que de uma forma ou outra me apoiaram nesta empreitada, especialmente os amigos Drs. Délio J. Kipper, Renato Machado Fiori e Pedro Celiny Ramos Garcia.

Aos colegas e amigos do “Respiratory Sciences Center” da Universidade do Arizona pela paciência em me ‘iniciar’ no mundo da epidemiologia e estatística de forma tão contagiante; em especial os Drs. Catharine Holberg, Duane Sherrill e Wayne Morgan.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq – pelo inestimável apoio através da bolsa de doutorado sandwiche, durante os anos de 1995 e 1996.

Aos meus orientadores: Dr. Fernando Abreu, pela elegância no trato desta situação incomum de desenvolvimento desta tese à longa distância; Dr. Fernando D. Martinez, principalmente pela amizade e apoio, mas também pela orientação segura que literalmente me “contaminou” com sua paixão pelo estudo da história natural da asma.

Às minhas três grandes companheiras de jornada, Lilian, Raquel e Paloma.

RESUMO

Uma série de trabalhos recentes indicam que sibilância durante a infância seja uma condição heterogênea, e que diferentes formas de sibilância podem estar associadas a diferentes fatores de risco e prognóstico. Nestes 2 estudos aqui relatados, realizamos testes de labilidade das vias aéreas, e medidas de identificação de atopia, bem como testamos sua relação com possíveis fenótipos de sibilância durante a infância.

Na pesquisa 1 foi estudada uma coorte de crianças seguidas desde o nascimento até a idade de 11 anos, quando foram testadas a variabilidade de pico de fluxo expiratório e a resposta ao desafio com metacolina, as quais foram comparadas à história de sibilância antes dos 3 anos, aos 6 e 11 anos de idade. Também se mediu IgE sérico total e responsividade a alergenos. Neste estudo se observou que crianças sibilando somente abaixo dos 3 anos, e não após, não apresentavam variabilidade de pico de fluxo expiratório ou hiper-responsividade à metacolina. Crianças sibilando aos 6 e 11 anos de idade apresentavam resposta positiva em ambos os testes. Variabilidade de pico de fluxo expiratório, porém, estava associada a sibilância aos 6 anos de idade, mas não aos 11 anos em crianças não atópicas. Hiper-responsividade à metacolina foi mais frequentemente observada em meninos, e era significativamente associada a IgE aos 6 e 11 anos de idade, e com testes cutâneos alérgicos positivos. Variabilidade do pico de fluxo expiratório não estava associada a sexo ou a marcadores de atopia.

Na pesquisa 2, em um sub-grupo da mesma coorte se estudou esta relação entre os fenótipos de sibilância e os níveis de IgE sérico, desde os 9 meses até os 11 anos de idade. Neste estudo se levou também em conta o tempo de sensibilização cutânea a alergenos comuns (aos 6 anos: precoce; aos 11 anos: tardia). Para análise destes dados longitudinais se utilizou um método estatístico chamado modelo de efeitos ao acaso ("random effects model") para estudo dessas complexas interações.

O principal achado deste estudo é de que os níveis séricos de IgE seguem um mesmo padrão com a idade, para os diferentes fenótipos de asma. Crianças com níveis elevados de IgE aos 9 meses de idade, continuavam com níveis elevados aos 6 e 11 anos. Sibilância persistente e sensibilização precoce estavam associadas a níveis elevados de IgE em todas as épocas. Os meninos apresentavam níveis elevados de IgE desde os 9 meses de idade, independente do fenótipo de sibilância, com exceção do grupo que sibilava somente abaixo dos 3 anos de idade. Somente as meninas que sibilavam persistentemente e haviam sido sensibilizadas precocemente tinham altos níveis de IgE desde cedo.

Com os achados deste estudo pode-se concluir que existem ao menos 3 fenótipos de sibilância durante a infância: "sibilantes transitórios precoces", limitados aos 3 primeiros anos de vida, e não relacionados a labilidade das vias aéreas ou a atopia; "sibilantes não atópicos", que abrange até a idade pré-escolar e associada a variabilidade de pico de fluxo expiratório, mas não à hiper-responsividade à metacolina; e "asma/sibilância associada a IgE", que apresenta sibilância persistente, hiper-responsividade à metacolina, e a marcadores de atopia. Mais

ainda, crianças que são sibilantes persistentes e são sensibilizados precocemente apresentam os níveis mais elevados de IgE, comparados aos outros fenótipos.

ABSTRACT

There is increasing evidence that wheezing during childhood may be a heterogeneous condition, and that different forms of wheezing may be associated with different risk factors and prognosis. In the 2 studies presented here we measured airway lability and markers of atopy that could help identify distinct wheezing phenotypes during childhood.

In the first study we evaluated a cohort of children followed from birth up to age 11 years. They were tested for peak flow variability and methacholine challenge response at age 11 and the association with wheeze before age 3, at age 6 and age 11 was measured. Total serum IgE and skin test reactivity to allergens were also determined. Neither peak flow variability nor methacholine hyperresponsiveness measured at age 11 were associated with wheezing occurring only during the first three years of life. Both methacholine hyperresponsiveness and positive peak flow variability were associated with wheezing at both ages 6 and 11. In addition, positive peak flow variability was associated with wheezing up to the age of 6 but not at age 11 in non-atopic children. Methacholine hyperresponsiveness was measured at age 11 was more frequently observed in boys and was strongly associated with serum IgE levels measured at ages 6 and 11 and with positive skin test reactivity. Peak flow variability was unrelated to sex or markers of atopy.

In the second study, a subgroup of the same cohort was tested for the relation between wheezing phenotypes and serum IgE levels, from 9 months to 11 years of age. The timing of skin test sensitization to allergens (at age 6: early sensitization; at age 11: late sensitization) was also measured and introduced in the models. A random effect model was used to analyze these complex interactions. The main finding is that total serum IgE levels track with age. Subjects with high serum IgE levels at age 9 months continued to have high IgE levels at ages 6 and 11. Persistent wheezing and early sensitization were associated with high serum IgE levels at all times. Boys had high serum IgE levels as early as age 9 months for all phenotypes, except the early wheezers compared to non-wheezers, while only girls with persistent wheezing and early sensitization had elevated IgE levels at age 9 months. Children who wheezed only in the first years of life and not after (i.e. early wheezers) had serum IgE levels that were not different than non-wheezing children.

With the findings of these studies one can conclude that there are at least 3 wheezing phenotypes during childhood: “early transient wheezing”, limited to the first 3 years of life and unrelated to increased airway lability or markers of atopy; “non-atopic wheezing” of the toddler and early school years associated with positive peak flow variability but not with methacholine hyperresponsiveness; and “IgE-associated wheeze/asthma” associated with persistent wheezing at any age and with methacholine hyperresponsiveness, peak flow variability, and markers of atopy. Further still, children who are persistent wheezers and early sensitized have the highest IgE levels when compared to the other phenotypes.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1.	Asma como uma doença do crescimento	3
2.2.	Heterogeneidade dos sintomas asmáticos ou asmatiformes	6
2.3.	A Relação Entre Doenças Respiratórias de Vias Aéreas Inferiores e Asma Durante a Infância	7
2.4.	As Primeiras Décadas de Vida	9
2.4.1.	Função Pulmonar e Sibilância por IVAIs	9
2.4.2.	Asma Crônica e os Primeiros Anos de Vida	10
2.4.3.	História Natural da Asma na Idade Pré-Escolar, Adolescência e Início da Idade Adulta	12
2.5.	Viroses e a Resposta Imune Seletiva Através de Linfócitos T	16
2.6.	Sibilância e a resposta eosinofílica	19
2.7.	Sensibilização Precoce a Alergenos Associados à Asma	21
2.8.	Interação Entre Meio Ambiente e Genética	23
3.	PESQUISA 1: Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório, Responsividade à Metacolina, e Atopia como Marcadores para Detectar Diferentes Fenótipos de Sibilância na Infância	26
3.1.	Hipóteses	26
3.2.	Objetivos	26
3.2.1.	Geral	26
3.2.2.	Específicos	27
3.3.	Sujeitos e Métodos	28
3.3.1.	População e Desenho do Estudo Longitudinal	28
3.3.2.	Definição da Variável Clínica Principal: Sibilância	28
3.3.3.	Definição de Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE)	29
3.3.4.	Definição da Variável Bronco-Provocação com Metacolina	31
3.3.5.	Definição dos Marcadores de Atopia	32
3.3.6.	Análise Estatística	33
3.3.7.	Apectos Éticos	33

3.4.	Resultados	33
3.4.1.	População estudada	33
3.4.2.	Valores Normais: Amp%med e CDR-Metacolina	34
3.4.3.	Hiper-Responsividade à Metacolina e Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE) aos 11 Anos: Associação com Sibilância em Diferentes Idades, Testes Cutâneos Alérgicos e Gênero	36
3.4.4.	Hiper-Responsividade à Metacolina e Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE) aos 11 Anos: Associação com Grupos de Sibilantes aos 3 e 6 Anos	38
3.4.5.	Hiper-Responsividade à Metacolina e Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE) aos 11 Anos: Associação com Grupos de Sibilantes aos 6 e 11 anos	41
3.4.6.	Hiper-Responsividade à Metacolina e Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE) aos 11 Anos: Associação com IgE Sérico Total Medido em Diferentes Idades	41
3.5.	Discussão	44
4.	PESQUISA 2: IgE Sérico Total e Sua Associação com Fenótipos de Sibilância e Sensibilização Alérgica em Crianças	50
4.1.	Introdução	51
4.2.	Hipóteses	52
4.3.	Objetivos	52
4.3.1.	Geral	52
4.3.2.	Específicos	52
4.4.	Sujeitos e Métodos	53
4.4.1.	População estudada	53
4.4.2.	Análise de IgE Sérico Total	53
4.4.3.	Testes cutâneos alérgicos	54
4.4.4.	Sintomas Respiratórios	55
4.4.5.	Métodos Estatísticos	55
4.4.6.	Aspectos Éticos	58
4.5.	Resultados	58

4.5.1.	Associação Entre IgE e Testes de Sensibilização Cutâneos	59
4.5.2.	Associação Entre IgE e os Fenótipos de Sibilância	63
4.5.3.	Associação Entre IgE, Sibilância e Testes de Sensibilização Cutâneos	66
4.6.	Discussão	71
5.	CONCLUSÃO	77
6.	BIBLIOGRAFIA	82
7.	ANEXOS	94

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Características dos sujeitos que fizeram teste de pico de fluxo expiratório (PFE), teste de desafio à metacolina (Mtc) e dos sujeitos que não fizeram nenhum teste (grupo de referência) durante a enquete dos 11 anos de idade 35
- Tabela 2. Associação de hiper-responsividade à metacolina (Mtc positiva) e variabilidade ao pico de fluxo expiratório (VPFE positiva) aos 11 anos: sibilância a diferentes idades, testes cutâneos e sexo: Análise Univariada 37
- Tabela 3. Associação entre hiper-responsividade à metacolina (Mtc positiva) e variabilidade ao pico de fluxo expiratório (VPFE) medidas aos 11 anos de idade, com sibilância em diferentes idades, testes cutâneos alérgicos e sexo: Análise de Regressão Logística Multi-variada 39
- Tabela 4. Associação de hiper-responsividade à metacolina (Mtc positiva) e variabilidade de pico de fluxo expiratório (VPFE positiva) medidos aos 11 anos de idade, com sibilância aos < 3 e 6 anos 40
- Tabela 5. Associação* de hiper-responsividade à metacolina (Mtc positiva) e variabilidade ao pico de fluxo expiratório (VPFE positiva) medidos aos 11 anos de idade, com sibilância aos 6 e 11 anos 42
- Tabela 6. Dados estatísticos descritivos para os crianças com ao menos uma avaliação de IgE sérico e sibilância avaliada em todas as três enquetes 61
- Tabela 7. Média e desvio padrão da média do log. de IgE em relação à sensibilização cutânea alérgica 61
- Tabela 8. Média e desvio padrão da média para log. de IgE em relação aos fenótipos de sibilância 64
- Tabela 9. Média e desvio padrão da média do log. de IgE, de sibilância e sensibilização à testes cutâneos alérgicos (como efeitos principais) em relação à interação de sibilância e sensibilização em meninos 68
- Tabela 10. Média e desvio padrão da média do log. de IgE, de sibilância e sensibilização à testes cutâneos alérgicos (como efeitos principais) em relação à interação de sibilância e sensibilização em meninas 69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Proporção de sujeitos com variabilidade de pico de fluxo expiratório (VPFE) ou resposta ao desafio à metacolina positiva, em relação aos níveis séricos de IgE 43
- Figura 2. Prevalências anuais hipotéticas de sibilância, para os três fenótipos de sibilância na infância 49
- Figura 3. IgE médio e intervalo de confiança de 95% para o Modelo 1, usando a análise de medições repetidas (“Random effects model”, REM) para meninos e meninas: tempo da sensibilização cutânea alérgica 62
- Figura 4. IgE médio e intervalo de confiança para o Modelo 2, usando a análise de medições repetidas (“Random effects model”, REM) para meninos e meninas: sintomas de sibilância 65
- Figura 5. IgE médio e intervalo de confiança para o Modelo 3, usando a análise de medições repetidas (“Random effects model”, REM) para meninos e meninas: interação entre tempo de sensibilização e história de sibilância 70

ANEXOS

Anexo 1: "Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood" .*Renato T. Stein, Catharine J. Holberg, Wayne J. Morgan, Anne L. Wright, Enrico Lombardi, Lynn Taussig, Fernando D. Martinez. Thorax 1997; 52:946-952* pág. 94

Anexo 2: "Total Serum IgE and its Association with Asthma Symptoms and Allergic Sensitization among Children". *Renato T. Stein, Duane L. Sherrill, Marilyn Halonen, Catharine J. Holberg, Anne L. Wright, Fernando D. Martinez. Encaminhado à publicação: Annals of Allergy and Clinical Immunology 1998*

Anexo 3: "Cold Air Challenge at Age 6 and Subsequent Incidence of Asthma".*Enrico Lombardi, Wayne J. Morgan, Anne L. Wright, Renato T. Stein, Catherine J. Holberg, Fernando D. Martinez. Am J Respir Crit Care Med*

Anexo 4: "On Early Sensitization to Allergens and Development of Respiratory Symptoms". *Duane Sherrill, Renato T. Stein, Fernando D. Martinez. A ser encaminhado para publicação em breve. Eur Respir J*

1. INTRODUÇÃO:

Os estudos apresentados nesta tese foram desenvolvidos por este doutorando durante o período de Janeiro de 1995 a Dezembro de 1997, na Universidade do Arizona, Tucson, E.U.A. As pesquisas descritas nesta tese, fazem parte de um conjunto maior de publicações do "Respiratory Sciences Center" da Universidade do Arizona, os quais vêm contribuindo decisivamente para o conhecimento da história natural e fatores de risco da asma e sibilância durante a infância. Uma coorte de mais de 1200 crianças vem sendo acompanhada desde o nascimento (1980 a 1984) por pesquisadores desse centro, com o objetivo específico de estudar a história natural e fatores de risco associados com doenças respiratórias. Neste sentido, este é o único estudo no mundo que acompanhou um número tão grande de crianças desde o nascimento, por um período tão grande de tempo.

Algumas das contribuições mais importantes desse estudo (revisadas em maior detalhe na seção seguinte) referem-se à existência de diferentes fenótipos de sibilância durante a infância, com prognósticos distintos e fatores de risco específicos. A maioria das publicações anteriores, referentes a essa coorte estudou estes fatores até a idade de 6 anos. A Pesquisa 1 apresentada nesta tese (Anexo 1: reprodução do trabalho original, publicado recentemente: RT Stein, CJ Holberg, WJ Morgan, AL Wright, E Lombardi, LM Taussig, Fernando Martinez. Peak Flow Variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* 1997; 52: 946-952) mostra a evolução desta coorte, agora

acompanhada até a idade de 11 anos, tendo o autor utilizado provas de função pulmonar e marcadores de atopia para o estudo de fatores de risco e história natural da sibilância até esta idade (com a consequente definição dos possíveis fenótipos de sibilância).

Esse trabalho (Pesquisa 1) procurou confirmar o que dados de literatura também já haviam indicado, ou seja, que um dos fatores de risco significativamente associado à persistência de sibilância durante esses primeiros anos de vida dizia respeito aos níveis elevados de IgE sérico. A confirmação desta associação levou à realização de um segundo trabalho, envolvendo a história natural da atopia, em relação aos diferentes fenótipos de sibilância, levando-se em conta também o momento em que as crianças foram sensibilizadas a alérgenos ambientais (Pesquisa 2, Anexo 2: RT Stein, DL Sherrill, M Halonen, CJ Holberg, AL Wright, FD Martinez. Total Serum IgE and its Association with Asthma Symptoms and Allergic Sensitization among Children (*Am J of Allergy and Clin Immunol*).

Uma terceira pesquisa, também relacionada às referidas acima, estudou um outro método de avaliação de hiper-reatividade brônquica, o desafio com ar frio, em relação ao risco de persistência de sibilância no período entre 6 e 11 anos de idade, em um sub-grupo de crianças dessa mesma coorte (Anexo 3: Cold Air Challenge at Age 6 and Subsequent Incidence of Asthma. Lombardi E, Morgan WJ, Wright AL, Stein RT, Holberg CJ, Martinez FD. *American Journal of Respiratory and Clinical Care Medicine* 1997; 156:1863-1869). Os achados principais deste estudo são discutidos

brevemente na seção de revisão de literatura, pois complementam e oferecem ainda maior substrato aos achados das pesquisas 1 e 2.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1. Asma como uma doença do crescimento

Há fortes evidências sugerindo que a prevalência, morbidade e mortalidade de asma têm aumentado durante os últimos 40 anos (1). Dados dos Estados Unidos indicam que a asma afeta mais de 12 milhões de pessoas, ocasionando 7,1 milhões de consultas médicas, 1,4 milhões de visitas a salas de emergência, sendo ainda responsável por ao menos 5000 mortes (2). Embora não se tenha dados estatísticos tão detalhados para o Brasil, supõe-se que o problema não seja aqui de menor magnitude. Nos últimos anos houve progressos significativos no entendimento da patogênese e fatores de risco para asma em todas as idades. Há hoje em dia um consenso em se considerar asma como uma doença inflamatória das vias aéreas (3), geralmente associada à sensibilização a aeroalergenos comuns (4). Apesar de todos esses avanços, ainda sabe-se pouco sobre os mecanismos genéticos e evolutivos que iniciam o processo de resposta anormal a estímulos ambientais, o qual é característico da asma. O reconhecimento dos fatores de risco para o desenvolvimento e/ou remissão dos diferentes fenótipos de asma em diferentes idades contribui para o entendimento dos mecanismos responsáveis por esta síndrome complexa, servindo também para indicar possíveis estratégias para prevenção dessa epidemia global.

Novos conhecimentos sobre os mecanismos de desenvolvimento da asma são consequência de recentes avanços em nosso conhecimento da história natural da asma. Muitos desses avanços recentes foram feitos através de contribuições importantes do estudo longitudinal da coorte de Tucson, Arizona, nos Estados Unidos (5). O material a ser apresentado nesta tese de doutorado, bem como em boa parte desta revisão é baseado em achados observados nessa coorte acompanhada desde o nascimento, que teve como objetivo principal estudar doenças respiratórias na infância. O quadro que resulta destes achados recentes é o de que asma seria uma doença estratificada e complexa revelando-se através de diferentes fenótipos em diferentes idades e com diferentes expressões clínicas a cada idade. Nas crianças, estas expressões clínicas dependeriam de qual caminho evolutivo o sistema imunológico e o sistema respiratório seguem, dependendo de uma série de interações complexas entre predisposição genética e influências ambientais, sendo que o momento (“timing”) dessas interações também parece ser de fundamental importância.

Há várias evidências apoiando o conceito de que asma é uma doença relacionada ao “desenvolvimento”. As respostas imunológicas a determinadas exposições variam muito com a idade, principalmente as de IgE sérica total e IgE-específica a alérgenos, as quais estão muito associadas à prevalência de asma. Quando a sensibilização a aero-alérgenos ocorre muito precocemente na vida cresce o risco de aparecimento de sintomas relacionados à asma (6). Ao contrário, se esta sensibilização ao mesmo tipo de alérgenos ocorre mais tardiamente na vida, ela não está associada ao aparecimento de asma (7). Exposição a alérgenos domiciliares,

como o dermatofagóides na poeira doméstica podem aumentar a expressão da hiperreatividade brônquica (HRB) durante o primeiro ano de vida (8). Esse fato pode explicar a forte correlação entre HRB medida logo após o nascimento e HRB medida aos 6 anos de idade (9), bem como a associação de asma de início precoce com exposição ao dermatofagóides nos primeiros anos de vida, comum em muitos ambientes (10). Uma fase importante do processo de diferenciação e expansão clonal de células T helper continua nos primeiros meses de vida (11) e a chance de uma pessoa ser sensibilizada a alérgenos geralmente associados à asma pode depender do curso seguido por esse processo de maturação. Por exemplo, monócitos de sangue periférico de recém-nascidos que desenvolverão eczema produzem já com esta idade baixos níveis de interferon-gama (12), a qual é uma importante citocina “protetora” (pois bloqueia o eixo “T helper 2”, que produz as células inflamatórias associadas a asma e outras doenças alérgicas) ao desenvolvimento de doenças alérgicas. Certas infecções respiratórias virais podem afetar a maturação do sistema imunológico, dependendo do estágio de desenvolvimento em que este se encontre (13).

O sistema respiratório também parece desenvolver-se de distintas formas, dependendo das exposições encontradas em períodos específicos. Infecções respiratórias que acontecem no início da vida podem afetar a maturação do pulmão/vias aéreas (14). Exposição ao cigarro (15) e tipo de alimentação no primeiro ano de vida (16,17,18) podem influenciar o processo responsável pelo crescimento pulmonar, associando-se pois, ao aparecimento da asma. Além disso, a prevalência de HRB não-específica é muito alta nos primeiros anos de vida (19), a qual diminui gradualmente

com a idade (20). A função pulmonar, medida por provas de fluxo expiratório forçado, aumenta mais lentamente em indivíduos com hiper-responsividade de vias aéreas (21), o que indica que o crescimento de função pulmonar e responsividade estão relacionados. Todas essas informações sugerem que, em indivíduos suscetíveis, uma sequência de eventos ocorrendo em épocas diferentes da vida podem afetar o desenvolvimento do sistema imunológico e das vias aéreas, com apenas alguns caminhos específicos levando a asma.

2.2. Heterogeneidade dos sintomas asmáticos ou asmatiformes

A presença de diferentes condições clínicas associadas a obstruções respiratórias de vias aéreas inferiores dificulta o entendimento da patogenia da asma. A maioria das crianças com asma apresenta-se com episódios recorrentes de sibilância e dispnéia que podem ser desencadeados por infecções respiratórias virais ou através da exposição a estímulos ambientais tais como alérgenos, ar frio, fumaça de cigarro, e vários outros. Sibilância, no entanto, é simplesmente a expressão de uma restrição mecânica ao fluxo das vias aéreas, que uma vez obstruídas, provocam um som agudo característico, de sibilância polifônica. Os fatores que provocam alterações associadas com o estreitamento intermitente das vias aéreas durante a infância são múltiplos. Uma vez que a asma é raramente letal durante a infância e porque só recentemente estudos etiológicos invasivos se tornaram viáveis neste grupo etário, nosso conhecimento sobre as alterações patológicas que ocorrem nas vias aéreas de crianças asmáticas acaba sendo muito limitado. O conceito de asma como doença inflamatória foi baseado em estudo de populações adultas, sendo que existem poucos

estudos comprovando estes conceitos em crianças. Entretanto, estudos longitudinais têm demonstrado que a maioria dos casos de asma começam na infância (22), e de que a maioria das crianças com asma apresentam sinais e sintomas similares aos encontrados nos adultos. É portanto razoável supor-se que uma proporção significativa de crianças com asma tenha uma condição semelhante àquela dos adultos.

A possibilidade de que fenótipos de sibilância possam coexistir durante a infância foi sugerida por estudos longitudinais recentes (23). Mesmo que estes fenótipos de sibilância possam se sobrepor durante a infância, eles parecem estar associados a diferentes fatores de risco. Diminuição de função pulmonar quando avaliada logo aos primeiros meses de vida é considerada fator de risco importante associado à sibilância durante infecções de vias aéreas inferiores (IVAls) nos primeiros anos de vida, independente de qualquer relação com aumento de IgE sérico.

2.3. A Relação Entre Doenças Respiratórias de Vias Aéreas Inferiores e Asma Durante a Infância

Há boas evidências indicando que as IVAls de etiologia viral que ocorrem nos primeiros anos da vida estejam associadas a um maior risco de provocar asma anos mais tarde (24). No entanto, até recentemente, os fatores que explicavam esta relação não eram bem compreendidos. Estudos anteriores feitos em crianças que tiveram bronquiolite viral no primeiro ano de vida mostraram que estas crianças apresentavam hiper-reatividade bronquial muitos anos após este insulto viral. Estudos de função pulmonar em crianças mais velhas e adolescentes também mostraram que indivíduos

com uma história de IVAIs nos primeiros anos de vida apresentavam diminuição significativa de vários parâmetros espirométricos, especialmente aqueles derivados de curvas fluxo-volume (25). Se sugeriu então que as IVAIs seriam responsáveis por alterar o desenvolvimento das vias aéreas e ocasionar uma maior propensão a respostas anormais a estímulos externos. Esta idéia também foi corroborada por vários estudos realizados por Welliver e colaboradores (26), que observaram que em alguns lactentes, IgE específica para vírus podia ser detectada em secreções nasais e se observava uma correlação entre a quantidade de IgE específica para vírus e a severidade da IVAI e também com maior risco de que sintomas de sibilância persistiriam até a idade de 7 a 8 anos (27). Estes resultados foram na ocasião, interpretados como indicativos de uma relação causal entre a infecção viral e asma; a infecção seria, pois, o agente desencadeador de alterações inflamatórias crônicas características da asma.

Estudos mais recentes indicam a existência de uma outra explicação para esta associação. Alguns autores (28,29) mostraram que baixos níveis de função pulmonar antecedem os sintomas respiratórios por IVAIs em crianças normais. Estas descobertas ajudaram a identificar dois diferentes fenótipos de sibilância em crianças até 6 anos de idade. Pelo menos 1/3 das crianças abaixo de 3 anos terão ao menos um episódio de sibilância causada por IVAIs, e aproximadamente 60% destas não terão mais estes episódios à idade de 6 anos (23). A maioria dessas viroses são causadas pelo Vírus Sincicial Respiratório (VSR), pelo vírus Parainfluenza, e em menor frequência, pelo Adenovírus e Influenza (30). Em crianças mais velhas, o Rinovírus

está mais comumente associado a infecções respiratória causando sibilância (31). Estes dados sugerem que os mecanismos responsáveis por obstrução respiratória associada a infecções virais podem ser diferentes em crianças de diferentes idades. Certos fatores, porém, são comuns a todos os vírus que causam sibilância na infância. Os meninos tendem a apresentar sibilância com maior frequência que meninas (32), e maior frequência de sibilância também é encontrada em crianças de menor nível sócio-econômico e nas que têm mães com menor nível de escolaridade (33). Crianças que passam várias horas do dia em creches também têm maior chance de ter sibilância com infecções respiratórias virais (34). Portanto, fatores que aumentam a chance de ser infectado por vírus e fatores associados com o tipo de resposta aos vírus tendem a aumentar o risco de sibilância.

2.4. As Primeiras Décadas de Vida

2.4.1. Função Pulmonar e Sibilância por IVAIs

Como mencionado acima, crianças que apresentam sibilância com IVAIs aos 3 anos de idade e que não estão mais sibilando aos 6 anos de idade, não apresentam nenhum dos fatores de risco associados ao tipo de asma crônica que persiste durante a infância e a adolescência, e, especificamente, não apresentam aumento da prevalência de marcadores alérgicos ou de história familiar de asma (23). No entanto, este grupo de pacientes, rotulado de "sibilantes transitórios precoces", apresenta função pulmonar menor que pacientes que não tiveram IVAIs, quando esta é medida nas primeiras semanas de vida, antes que qualquer agressão viral tenha ocorrido. Com estes achados, pode-se inferir que nestas crianças que nascem com função pulmonar

diminuída, IVAIs causam uma obstrução respiratória de origem mecânica, por edema ou impacação mucóide nas vias aéreas, originadas pela infecção viral. Uma vez que o crescimento das vias aéreas é maior do que o crescimento pulmonar durante a infância (35) o impacto dessas vias aéreas diminuídas em sua relação com sibilância nos primeiros anos de vida diminui, à medida que estas crianças crescem e o diâmetro das vias aéreas deixa de ser tão crítico. Portanto, a maioria dessas crianças que sibila com infecções virais passa a ser assintomática após esta idade crítica dos primeiros anos de vida, mas mantém baixos níveis de função pulmonar mesmo vários anos após seus episódios agudos de IVAIs.

2.4.2. Asma Crônica e os Primeiros Anos de Vida

A descoberta de que função pulmonar diminuída é um achado que precede o aparecimento de quadros virais com sibilância propiciou uma explicação para o fato de sintomas respiratórios ocorrerem nos primeiros anos de vida em pelo menos 60% das crianças que não apresentam fatores de risco para manterem-se sibilando quando mais velhas (23). No entanto, as causas para que sibilem os 40% restantes dessas crianças (crianças que continuam com episódios recorrentes de sibilância até a idade de 6 anos, e são chamadas de “sibilantes persistentes”) ainda não estão bem esclarecidas. Estas crianças, desde os primórdios da vida, apresentam função pulmonar que não é significativamente diferente da função pulmonar de crianças que nunca apresentarão sibilância, e portanto, explicar sibilância através da diminuição de calibre de vias aéreas, como acontece com os sibilantes transitórios precoces não parece plausível. Infelizmente, é impossível separar-se este grupo de crianças, do grupo com bom

prognóstico puramente através de dados clínicos; além disso, testes de função pulmonar para lactentes não são simples o suficiente para serem feitos rotineiramente para identificar indivíduos com maior risco de manterem-se sibilando. Entretanto, dados indiretos indicam que estes sibilantes persistentes apresentam vários dos fatores de risco que se sabe estarem associados à asma na infância: elas apresentam uma história positiva de asma na família, são predominantemente meninos (ao redor de 60%), geralmente apresentam episódios de sibilância mesmo quando não estão gripados durante o primeiro ano de vida, e apresentam também uma alta prevalência de dermatite atópica e rinite (23). Mais importante ainda, estas crianças apresentam também IgE sérico aumentado desde o primeiro ano de vida. Todas essas evidências sugerem que estas crianças apresentam obstrução das vias aéreas através de um mecanismo similar àquele que causa asma crônica em crianças mais velhas, ou seja, através de uma forma de inflamação crônica das vias aéreas, a qual é mediada por IgE. Os achados de Welliver e colaboradores (26,27) mostraram que crianças que posteriormente apresentarão sibilância persistente têm níveis elevados de IgE específica para vírus e aumento nos níveis de histamina em secreção nasal durante os episódios de IVAs com sibilância. O que não se sabe é se esta IgE específica para vírus é responsável por desencadear a obstrução de vias aéreas que se observa nestas crianças. Observações recentes do estudo longitudinal de Tucson ajudam a reinterpretar estes dados, pois mostram que crianças com sibilância persistente respondem a agressões virais com uma IgE elevada, medida através de IgE sérico total durante e aproximadamente 1 mes após o episódio viral (36). Esta resposta exagerada de IgE parece, no entanto, ser multiespecífica: lactentes sibilantes com IVAs que

apresentaram testes positivos para VSR na secreção nasal apresentam vírus específico contra VSR ou contra outros vírus tais como Para-Influenza. É possível, portanto, que a produção de IgE específica contra vírus possa ser uma consequência de uma tendência generalizada do sistema imunológico em responder exageradamente a essas agressões virais, e subsequentemente a outros estímulos ambientais tais como alérgenos.

Os dados que se dispõe hoje em dia, indicam que fatores genéticos e ambientais regulando a resposta de IgE e eosinófilos (discutido nas próximas seções) a infecções nos primórdios da vida, podem ser cruciais para o desenvolvimento de condições propícias ao aparecimento de asma crônica. É bem provável que muitos desses fatores interajam determinando um padrão específico de resposta, mas o fato de que tanto os níveis séricos de IgE e eosinófilos sejam controlados por citocinas produzidas por linfócitos do tipo Th-2 ("T-helper") indica que exista um processo de seleção desse sub-tipo de linfócito muito cedo na vida, indicando desde aí os primeiros sinais de asma.

2.4.3. História Natural da Asma na Idade Pré-Escolar, Adolescência e Início da Idade Adulta

Existem poucos estudos que ofereçam dados sobre incidência e prognóstico da asma ou sibilância durante a idade escolar. Não se entende bem, por exemplo, se a idade de início dos sintomas de asma é fator importante que determina seu prognóstico, ou se a incidência de asma continua baixa após a idade de 8-10 anos, ou

ainda quais outros fatores determinam remissão ou reaparecimento da asma durante a infância.

O maior estudo prospectivo de seguimento é o estudo de diferentes grupos de crianças com sibilância selecionadas à idade de 7 anos em 1964 em Melbourne, na Austrália (37). Este estudo apresenta várias limitações metodológicas: informações sobre os primeiros anos de vida foram obtidas retrospectivamente à idade de 7 anos, o que pode induzir um viés de memória, e o grupo controle incluía apenas um pequeno número de crianças assintomáticas. Não existe porém qualquer outro estudo clínico com acompanhamento longitudinal até a idade de 35 anos, como este de Melbourne. Este estudo diferencia pelo menos 2 expressões clínicas de asma durante os primeiros anos do período escolar. No primeiro grupo, chamado de “asma episódica infrequente”, os pais indicaram na maioria das vezes que os episódios haviam iniciado só depois dos 3 anos de idade, eram geralmente associados a quadros virais, e apenas raramente estes eram severos. Em torno de 40 a 60% das crianças nesse grupo não haviam tido novamente estes episódios de sibilância aos 10 anos de idade, e remissão ainda estava ocorrendo durante a adolescência. Aproximadamente 10 a 20% das crianças que pararam de ter sintomas no final da primeira década de vida apresentaram novos episódios durante a adolescência e a vida adulta. Porém, muito poucos desses indivíduos desenvolveram asma persistente quando adultos. Neste grupo de asma episódica infrequente o nível de função pulmonar e o grau de hiper-reatividade brônquica medidos em idade adulta não apresentou-se diferente dos indivíduos do grupo controle.

Existem poucos estudos de acompanhamento de sintomas asmáticos desde a infância até a vida adulta. Um estudo recente de Aberdeen, na Escócia examinou um grupo de adultos que havia sido avaliado em relação à asma e sintomas de sibilância quando estes eram crianças (38). Três grupos de indivíduos foram incluídos nesta pesquisa: aqueles que tinham um diagnóstico de asma na infância (dado por um médico); aqueles cujos pais disseram que as crianças só sibilavam quando estavam gripadas; e um grupo que não havia tido sintomas respiratórios. Quando comparados com este último grupo, indivíduos que haviam tido asma durante a infância apresentavam um risco 14 vezes maior de sibilância e 7 vezes maior de ter hiper-responsividade brônquica à metacolina à idade de 34-40 anos. Indivíduos com asma na infância também tinham maior chance de usar medicação para asma e tinham menores níveis de função pulmonar na idade adulta. O prognóstico para crianças que apenas sibilavam com quadros virais era melhor do que para as crianças com asma. Indivíduos neste grupo tinham maior risco de sibilar com 34-40 anos do que crianças sem sintomas, mas estes sintomas eram leves e geralmente não eram empecilho a uma vida normal, o que era diferente para os que tinham diagnóstico de asma na infância. Provas de função pulmonar e resposta ao desafio com metacolina estavam dentro de limites normais neste grupo de sibilantes.

Estes resultados levam a crer que uma síndrome sibilante de características mais benignas provavelmente existe no início do período escolar, a qual é diferente da sibilância que afeta crianças com sintomas asmáticos mais persistentes ou severos. Wilson e colegas (39) sugeriram que hiper-responsividade brônquica (provocada por

metacolina ou por desafio com ar frio: DAF) talvez não esteja aumentada em um subgrupo de crianças ainda sibilando à idade de 4-5 anos. Estes autores propuseram a hipótese de que estas crianças talvez sibilem através de outros mecanismos, que não por inflamação das vias aéreas, a qual é característica dos indivíduos com asma crônica. Estas conclusões são porém, baseadas em um pequeno estudo não controlado (39).

Como parte do estudo de Tucson, Arizona, recentemente se avaliou a resposta das vias aéreas ao DAF em aproximadamente 500 crianças não selecionadas com 6 anos de idade, as quais faziam parte do grupo acompanhado longitudinalmente (Anexo 3, *Cold Air Challenge at Age 6 and Subsequent Incidence of Asthma: A Longitudinal Study*) (40). Neste estudo foi encontrada uma associação positiva entre sibilância no ano anterior ao questionário e resposta positiva ao DAF aos 6 anos de idade (razão de chances de 2,4; intervalo de confiança de 1,4-4,0). Além disso, resposta ao DAF era significativamente associada a testes cutâneos positivos a alérgenos ambientais comuns e à IgE sérica total. Resposta ao DAF aos 6 anos era pois, fortemente preditiva de sibilância aos 11 anos de idade, mas somente para crianças que já estavam sibilando aos 6 anos de idade. Este estudo mostrou que existiam pelo menos 2 grupos de crianças sibilando aos 6 anos de idade: um grupo (mais de 25% das crianças sibilando aos 6 anos) apresenta hiper-responsividade das vias aéreas e tem geralmente teste cutâneo positivo a alérgenos; a maioria destes pacientes (até 84%, se têm teste cutâneo positivo) ainda estarão sibilando aos 11 anos de idade. Um segundo grupo não apresenta hiper-responsividade brônquica e geralmente tem teste cutâneo negativo; apenas 34% desses pacientes ainda estarão

sibilando aos 11 anos de idade (40). Estes achados mostram que hiper-responsividade ao desafio com ar frio aos 6 anos de idade está associada a um diagnóstico subsequente de asma, mas que este efeito não é independente de atopia e sibilância aos 6 anos. Portanto, hiper-responsividade brônquica, isoladamente não leva à persistência de sintomas, pois está associada a outros fatores de risco.

É difícil estabelecer-se as causas para a sibilância neste último grupo de crianças identificadas como de bom prognóstico nos estudos de Aberdeen, Melbourne e Tucson. Fatores mecânicos aparentemente envolvidos na patogênese dos sibilantes transitórios precoces não parecem ser responsáveis pela sibilância neste grupo: função pulmonar aos 6 anos de idade (para os dados de Tucson) ou durante a infância e início de vida adulta (para os dados de Aberdeen e Melbourne) não era significativamente diferente neste grupo de sibilantes quando comparados com seus respectivos grupos controle. Como mencionado anteriormente, os resultados de Aberdeen e Melbourne sugerem que estas crianças têm sintomas principalmente relacionados a infecções respiratórias, e algum tipo de alteração poderia existir a nível de resposta imunológica a infecções nessas crianças. O estudo dos diferentes fenótipos de sibilância na infância adquire pois fundamental importância, ajudando a esclarecer os mecanismos responsáveis por estes sintomas, oferecendo uma perspectiva mais específica em termos de evolução e prognóstico de possíveis fenótipos.

2.5. Virose e a Resposta Imune Seletiva Através de Linfócitos T

Os fatores que determinam a natureza da resposta imunológica provocada por viroses respiratórias ainda não são bem compreendidos. Em um trabalho publicado

recentemente, Anderson e colaboradores (41) estudaram citocinas em monócitos de sangue periférico para se identificar o padrão de resposta das células "T helper" após agressão por VSR. Estes autores mostraram que as células expostas ao VSR apresentaram predominantemente aumento na produção de inter-leucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), dados estes consistentes com uma resposta imune tipo Th-1.

Os vírus têm sido pois, implicados na determinação do tipo reação celular "T helper" que é selecionado no início da vida em indivíduos suscetíveis. Por algum tempo, evidência circunstancial pareceu associar infecções virais à predisposição a alergias. Estes dados nos levariam a crer que as infecções virais poderiam aumentar a seleção de clones Th2 no início da vida. Este conceito foi recentemente contestado através de estudos epidemiológicos em Tucson que mostraram uma relação inversa entre infecção e o aparecimento de alergias em uma grande população estudada (23). Existem poucos achados experimentais apoiando qualquer uma destas hipóteses. Kudlacz e Knippenberg (42) estudaram os efeitos da infecção pelo vírus Para-Influenza tipo 3 (PI-3) na resposta respiratória de ratos sensibilizados ao desafio com alérgenos. Eles descobriram que após ao desafio com os alérgenos, os animais sensibilizados apresentavam um número significativamente aumentado de eosinófilos no líquido de lavagem bronco-alveolar, comparado com animais não sensibilizados e também apresentaram hiper-responsividade das vias aéreas à nebulização com metacolina inalada. Quando a sensibilização foi iniciada 7 dias após a inoculação com PI-3 ela não provocou hiper-reatividade brônquica, aumento no número de eosinófilos no líquido de lavado brônquico, ou liberação de histamina pelo tecido pulmonar infectado. Estes

resultados indicam portanto, que infecções respiratórias no início da vida não aumentam a predisposição ao desenvolvimento de respostas alérgicas. Mais ainda, estes resultados indicam que infecções respiratórias virais podem bloquear a sensibilização a antígenos ou a liberação de mediadores de mastócitos, resultando na atenuação dos efeitos respiratórios associados ao desafio com antígenos em animais sensibilizados.

Estudos realizados em Tucson, apóiam a hipótese de que certas infecções podem aumentar um padrão de resposta imune tipo Th-1, bloqueando assim respostas de padrão alergênico, tipo Th-2 (43). Níveis séricos de IgE total foram medidos das crianças acompanhadas pelo estudo, ao nascimento, 9 meses, e 6 anos de idade, e produção de IFN- γ por monócitos foi medida ao nascimento e 9 meses de idade nos 3 primeiros anos de vida de crianças sem história de IVAIs e naquelas com uma história de IVAI com sibilância (IVAIS) e nas com IVAI sem sibilância (IVAISS). Os resultados mostraram que crianças com IVAISS tinham produção de IFN- γ significativamente maior aos 9 meses de idade, quando comparados com os grupos de crianças sem sibilância ou com IVAIS. Crianças com IVAISS no começo da vida apresentaram níveis de IgE significativamente menores aos 9 meses e 6 anos, comparados com crianças com IVAS ou crianças sem IVAI. É portanto possível que crianças com certos tipos de infecções nas primeiras fases da vida possam mostrar aumentos significativos de respostas tipo Th1 com uma supressão associada da produção de IgE e sensibilização alérgica.

É impossível, com os conhecimentos atuais determinar porque certas crianças desenvolvem uma resposta tipo Th2 frente a infecções virais, aumentando seu risco de sensibilização alérgica e de ter asma, enquanto outras crianças parecem ter um padrão de resposta diametralmente oposto, com aumento de uma resposta tipo Th1 e níveis de IgE sérico persistentemente baixos. Fatores genéticos parecem ter um papel importante, uma vez que filhos de pais atópicos têm menos células produtoras de IFN- γ do que crianças de pais não atópicos (43). Fatores ambientais também devem ter influência, uma vez que IFN- γ é produzido em grandes quantidades durante certas infecções (23). Pode-se especular que infecções virais repetidas, principalmente no início da vida, podem seletivamente incentivar a proliferação de células Th1, inibindo assim a proliferação de clones Th2 e o desenvolvimento de sensibilização alérgica. O contrário aconteceria com indivíduos menos expostos a infecções respiratórias, onde clones Th2 seriam preferentemente ativados, com um aumento na produção de IgE específica contra aero-alergenos e aumento da prevalência de sintomas asmáticos.

2.6. Sibilância e a resposta eosinofílica

Um achado interessante é que crianças “sibilantes transitórias precoces” e crianças “sibilantes persistentes” apresentam diferentes padrões de resposta eosinofílica a agressões virais (Martinez FD, dados ainda não publicados). Sibilantes transitórios precoces (e também crianças com IVAs sem sibilância) apresentaram uma resposta esperada a agressões virais ou bacterianas (44), ou seja, diminuição de eosinófilos circulantes. Entretanto, crianças sibilantes persistentes não apresentaram estas alterações nos níveis de eosinófilos circulantes. Garofalo e colaboradores (45)

publicaram recentemente um trabalho onde mostraram que crianças com infecções de vias aéreas superiores (IVAS) ou inferiores (IVAls) causadas por VSR mostraram supressão de eosinófilos durante infecção aguda, mesmo que esta tenha sido maior nas crianças com IVAls. Os resultados desses estudos realizados em Tucson sugerem que crianças que sibilam com IVAls podem ser divididas em 2 grupos, em relação ao nível sérico de eosinófilos: sibilantes transitórios precoces apresentam o mesmo nível de supressão de eosinófilos que crianças com IVAls não sibilantes, enquanto que sibilantes persistentes não apresentam esta supressão de eosinófilos, tendo portanto níveis elevados de eosinófilos durante o quadro viral agudo.

As causas de eosinopenia associada a infecções não são bem entendidas, mas marginação vascular e inibição de precursores de eosinófilos ao nível da medula óssea são algumas das hipóteses propostas (46). Os dados do estudo de Tucson indicam que os sibilantes persistentes apresentam alterações no controle do nível de eosinófilos circulantes, alteração esta que pode ser observada desde o primeiro episódio de IVAl. Garofalo e colaboradores (45) estudaram a concentração de proteína catiônica eosinofílica (PCE) em secreções da naso-faringe em um grupo de crianças com várias formas de doenças respiratórias. PCE é uma proteína citotóxica encontrada em grânulos de eosinófilos e se imagina que tenha algum papel na patogênese da asma. Estes autores descobriram que crianças com bronquiolite causada pelo VSR apresentam níveis mais elevados de PCE em secreção nasal, do que crianças com IVAS causada por VSR, ou por IVAls sem sibilância causadas por VSR, ou ainda que IVAS causadas por outros agentes que não o VSR. Infelizmente este estudo e alguns

outros nesta mesma área não são estudos longitudinais (45) ou o seguimento dos pacientes aconteceu apenas por um pequeno período (47), fazendo com que não pudesse se observar esta resposta nos diferentes fenótipos de sibilância, como definidos em estudos longitudinais.

2.7. Sensibilização Precoce a Alergenos Associados à Asma

Estudos realizados na Universidade do Arizona, em Tucson mostraram uma resposta diminuída de IFN- γ e IL-2 a estímulos indiretos (concanavalina e PHA) em monócitos de sangue periférico coletado aos 9 meses de idade, mas não a sangue coletado ao nascimento, em crianças que posteriormente (aos 6 anos de idade) terão teste cutâneo positivo para o fungo *Alternaria*, comparado com crianças com teste negativo a esse alérgeno (48). Nenhuma associação foi observada, entretanto, entre a produção destas citocinas por monócitos aos 11 anos de idade e sensibilização à *Alternaria* ou qualquer outro alérgeno, ou entre produção de citocinas antes da idade de 1 ano e sensibilização à *Alternaria* depois da idade de 6 anos (49). Estes resultados são muito interessantes, pois a associação entre a produção de citocinas e sensibilização alérgica no primeiro ano de vida mostrou-se muito específica para *Alternaria*. Na região semi-árida do Arizona, como em certas áreas desérticas da Austrália (50), *Alternaria* é o alérgeno mais comum associado a asma, na mesma proporção que alérgenos da poeira doméstica são o fator de risco principal para asma em regiões mais úmidas. Mesmo sendo um alérgeno extra-domiciliar, a *Alternaria* pode se tornar muito abundante no domicílio, principalmente em casas que usam um sistema de umidificação para refrescar o ambiente. Estes dados sugerem que existe um

processo muito precoce de seleção de clones tipo Th1 ou Th2, durante uma fase de desenvolvimento do sistema "T-helper". Uma diminuição relativa de clones Th1 pode predispor indivíduos expostos a certos alérgenos domiciliares (tais como *Dermatophagoides* ou *Alternaria*) a uma resposta imune tipo Th2, mediada por IgE, contrastando com uma resposta Th1 a estes mesmos alérgenos que acontece com indivíduos não alérgicos.

Este processo de sensibilização alérgica precoce parece estar fortemente associado ao desencadeamento de asma crônica no início da vida. Estudos feitos na Austrália (51) mostraram que indivíduos que se sensibilizaram antes da idade de 8 anos eram muito mais propensos a desenvolver sintomas asmáticos persistentes durante a infância, quando comparados a indivíduos que só se tornaram sensibilizados a estes antígenos depois da idade de 10 anos. Dados ainda não publicados (Sherril D, Stein RS et. cols, Anexo 4), de um estudo da Universidade do Arizona também confirmam estes achados australianos. Neste estudo também se observou que indivíduos que eram sensibilizados a aero-alérgenos no início da vida tinham testes cutâneos positivos a um maior número de alérgenos do que indivíduos que só foram sensibilizados mais tardiamente, com testes também mais persistentemente positivos e níveis de IgE sérico significativamente mais altos. Estes achados estão em concordância com os achados de Sears e colaboradores (52) da Nova Zelândia, que identificaram uma relação direta entre o número de testes cutâneos positivos aos quais o indivíduo é alérgico e o risco associado a sintomas asmáticos. Todos estes achados, quando entendidos em um contexto maior, indicam claramente que a

sensibilização alérgica que ocorre nos primeiros anos de vida deve ser um importante fator de risco associado à asma crônica. Este fato é geralmente relacionado a uma ativação multi-específica de clones tipo Th2, que deve estar ligada também a uma diminuição relativa de clones Th1 em indivíduos que serão sensibilizados a alérgenos muito cedo na vida. Esta ativação multi-específica pode ser uma característica importante da asma crônica e contrasta com o tipo de reação específica de IgE produzida contra por exemplo, infecções parasitárias, as quais não são geralmente associadas a sintomas alérgicos. Esta resposta multi-específica poderia ser a explicação de porque vários estudos têm observado que, mesmo entre indivíduos que apresentam testes cutâneos positivos a alérgenos comuns, existe uma correlação positiva significativa entre IgE sérico total e o risco de asma crônica ou sintomas asmáticos (4). Embora os dados de literatura reforcem esta associação entre IgE sérica total e asma, ainda se desconhece os mecanismos dessa associação e o perfil longitudinal da IgE em relação aos diferentes grupos de sibilantes da infância, como descrito nos parágrafos acima.

2.8. Interação Entre Meio Ambiente e Genética

As interações entre predisposição genética e influências ambientais são determinantes fundamentais da heterogeneidade de expressões clínicas da asma na infância. Hoje em dia já se tem uma base científica sólida indicando que a asma tem um forte componente genético. Estudos em gêmeos mostraram que aproximadamente metade da susceptibilidade para se desenvolver asma é determinado por influências genéticas (53). Estudos de análises de segregação têm entretanto demonstrado que a

asma é uma condição poligênica (54) e talvez quase não existam gens diretamente ligados à asma, e se estes existirem, são certamente de fraca influência. Em outras palavras, vários gens em associação com diferentes exposições ao meio ambiente serão reponsáveis por asma em diferentes idades.

A maioria dos estudos que investigou os determinantes genéticos da asma tratou de fenótipos intermediários para a asma, ou seja, fenótipos quantitativos ou qualitativos que estão associados à asma e que são mais acessíveis a uma análise. Um desses fenótipos é o de níveis séricos de IgE total. Estudos epidemiológicos recentes mostraram uma forte associação entre IgE sérica total e prevalência de asma em grandes populações (4,55). Além disso, nenhum sujeito com baixos níveis de IgE sérico, apresentavam asma (4,55). Sabe-se que os níveis de IgE sérico são agregados em famílias (56), e dados recentes do estudo da coorte pediátrica de acompanhamento de doenças respiratórias em Tucson mostraram que IgE sérica talvez seja controlada por gens maiores codominantes (57). Estes resultados confirmam estudos realizados por outros pesquisadores, mas apesar disso o mecanismo de hereditariedade não está determinado.

Marsh et al. (58) e Meyers et al. (59) recentemente publicaram estudos mostrando uma correlação entre níveis séricos de IgE em irmãos para alguns marcadores no cromossoma 5q. No entanto, enquanto o maior coeficiente de correlação observado por Marsh (58) estava localizado na região do gen para a citocina IL-4, Meyers e seu grupo (59) reportam seu maior coeficiente de correlação

com o marcador D5S436, que está localizado 10 milhões de bases distante da região do gen de IL-4. Estes resultados sugerem que existe mais de um loco no cromossoma 5q que participa da regulação dos níveis de IgE sérico em seres humanos, mas que o mecanismo hereditário e a exata localização do loco ou locos ligados a esses marcadores ainda estão para ser determinados. É muito provável, portanto, que a tarefa de se elucidar as bases genéticas para asma seja uma tarefa muito complexa, que se torna ainda mais complexa pelas diferentes interações desses gens com diferentes tipos de exposição ao meio ambiente, em diferentes épocas da vida.

3. PESQUISA 1: Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório, Responsividade à Metacolina, e Atopia como Marcadores para Detectar Diferentes Fenótipos de Sibilância na Infância (Anexo 1)

3.1. Hipóteses:

A identificação de diferentes fenótipos de sibilância durante a primeira década de vida, com ênfase especial para o período entre 6 e 11 anos de idade, usando-se marcadores como testes cutâneos alérgicos, IgE sérico, e provas de responsividade brônquica.

Os marcadores acima mencionados podem ajudar a identificar fatores de risco associados à sibilância nos diferentes sub-grupos longitudinais de crianças com estes sintomas.

3.2. Objetivos

3.2.1. Geral:

Avaliar a relação entre dois índices de labilidade das vias aéreas – variabilidade de Pico de Fluxo e a Curva de Dose-Resposta à Metacolina – medidos à idade de 11 anos, em relação à sibilância em diferentes idades (abaixo de 3 anos, 6 e 11 anos) e em relação a marcadores de atopia em uma grande população de crianças acompanhadas regularmente desde o seu nascimento.

3.2.2. Específicos:

- a) Descrever as características da amostra: idade, sexo, frequência dos sintomas de sibilância, provas de função pulmonar (através do valor médio da Volume Expiratório Forçado em 1 Segundo – VEF1), e respostas a testes cutâneos alérgicos nos grupos de crianças que realizaram provas de Pico de Fluxo Expiratório (PFE), nas que realizaram teste de desafio com metacolina e nas que não realizaram nenhum destes testes.
- b) Verificar a associação entre VPFE e responsividade à metacolina medidas aos 11 anos de idade, e sibilância aos 3 e 6 anos de idade.
- c) Verificar a associação entre VPFE e responsividade à metacolina medidas aos 11 anos de idade, e sibilância aos 6 e 11 anos de idade.
- d) Verificar a associação entre VPFE e responsividade à metacolina medidos aos 11 anos de idade em relação à resposta a testes cutâneos alérgicos medidos aos 6 e 11 anos de idade.
- e) Verificar a associação entre VPFE e responsividade à metacolina medidas aos 11 anos de idade em relação a IgE sérica medida em diferentes idades (ao nascimento, 9 meses, 6 e 11 anos).

3.3. Material e Métodos

3.3.1. População e Desenho do Estudo Longitudinal

Participantes nesse estudo foram selecionados a participar desse acompanhamento quando eram recém nascidos, entre Maio de 1980 e Outubro de 1984, como parte do Estudo Pediátrico de Doenças Respiratórias de Tucson (5). O grupo que iniciou o acompanhamento tinha um total de 1246 crianças. Maiores detalhes em relação à coleta de dados e procedimentos estão descritos em outros estudos (5,30). As crianças e seus pais eram clientes de um dos serviços de medicina de grupo da cidade, e eram representativos de uma população de classe média. Dados gerais sobre história prévia de enfermidades ou características sociais foram coletados por questionário ao nascimento, e sangue de cordão foi também aí obtido. Durante os 3 primeiros anos de vida, os pais responderam a 2 enquetes (1 e 3 anos de idade) com questionários e sangue periférico foi coletado à idade média de 9 meses. Neste período as crianças foram acompanhadas por seus pediatras e consultavam cada vez que apresentavam sintomas de IVAIs (todas essas consultas eram registradas em formulários desenhados para este fim). Novas enquetes foram repetidas aos 6, 8 e 11 anos de idade, com os pais respondendo sobre questões referentes a doenças respiratórias. Um número superior a 1000 crianças ainda continuava em acompanhamento na enquete dos 11 anos de idade.

3.3.2. Definição da Variável Clínica Principal: Sibilância

Durante os primeiros 3 anos de vida, os pais das crianças foram instruídos a consultar com o seu pediatra toda vez que a criança apresentasse sintomas de

infecção de vias aéreas inferiores (IVAls), e estes dados foram armazenados nas fichas do estudo preenchidas pelos médicos e os sintomas clínicos registrados. Quando as crianças estavam com a idade média de 6,3 (desvio padrão: 0,9) anos ("6 anos", n=1024) e 10,9 (desvio padrão:0,6) anos ("11 anos", n=956) os pais completaram questionários sobre os sintomas respiratórios de seu filhos. Nestas 2 enquetes, aos 6 e 11 anos de idade, sibilância foi definida como qualquer episódio de sibilância no período de 12 meses anterior a coleta de dados, em questionário respondido pelos pais, independente de qualquer diagnóstico de asma. Abaixo dos 3 anos, sibilância foi definida como episódios associados a IVAls, e diagnosticados pelo pediatra. Para avaliar a associação entre medidas de labilidade das vias aéreas com sibilância persistente ou remitente, os indivíduos incluídos nessa análise foram classificados de acordo com o seu padrão de sibilância no período compreendido entre < 3 e 6 anos de idade e no período entre 6 e 11 anos de idade.

3.3.3. Definição de Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE)

Um total de 754 crianças ainda estavam morando em Tucson à idade da enquete dos 11 anos. Destas crianças, um total de 676 levaram para casa medidores de PFE para registrar seus resultados 3 vezes ao dia, por 1 semana. As crianças e seu pais foram treinados pelas enfermeiras do estudo quanto ao uso do aparelho de PFE. Se solicitou aos participantes que registrassem em um diário a melhor de 3 tentativas, depois de acordar pela manhã, quando eles retornavam da escola à tarde, e antes de ir para a cama à noite. Para avaliar-se a "curva de aprendizado" em relação às medições de PFE foi utilizado o teste Q de Cochran (60) para as 3 sessões do dia no

período de 1 semana. Somente medidas da primeira manhã do estudo não eram homogêneas em relação ao resto do período, e foram portanto, retiradas da análise. Somente crianças com pelo menos 2 medidas diárias de PFE (após eliminação das medidas do primeiro dia de estudo) em ao menos 4 dias foram incluídas na análise (61).

A amplitude percentual média (Amp%med) foi escolhida como o índice de VPFE (60,62) e definida assim:

$$\text{Amp\%med} = \frac{\sum ((\text{PFE diário máximo} - \text{PFE mínimo}) / \text{PFE diário médio})}{\text{Número de dias no período}} \times 100$$

VPFE foi considerada positiva em indivíduos com valores de Amp%med acima do percentil 90, em relação a uma população de referência saudável (indivíduos com testes cutâneos negativos, que nunca haviam sibilado, nem haviam tido diagnóstico de asma, n=136). Para melhor validar a variável Amp%med e o seu ponto de corte, se avaliou um outro índice de VPFE que considera “lábéis” as vias aéreas de indivíduos com pelo menos 1 valor de PFE acima de 30% da média diária (63,64). Resultados usando este índice de 30% de variabilidade não foram significativamente diferentes dos encontrados com a Amp%med, e por esta razão somente os resultados com este último índice serão mostrados neste trabalho.

3.3.4. Definição da Variável Bronco-Provocação com Metacolina

Na época em que o estudo longitudinal foi planejado existiam algumas preocupações sobre a segurança e aceitação pelos pais dos teste de desafio com metacolina em crianças sintomáticas. Portanto, crianças que haviam usado medicações para asma nos 3 meses anteriores à data do teste foram excluídos desse desafio. Foram excluídas as crianças com IVAS nas 4 semanas precedentes ao desafio, ou 1 IVAs nas 6 semanas anteriores, ou ainda as que tinham problemas cardíacos, doenças sistêmicas ou reações adversas a metacolina, como cefaléia intensa. Os desafios foram baseados no protocolo descrito por Yan e colaboradores (65) com doses nebulizadas cumulativas de metacolina, variando de 0,0004 a 2,048 mg.

Resultados do desafio com metacolina foram expressados como a curva de dose-resposta à metacolina (CDR-Metacolina). Ao se chegar a 20% de queda do VEF1 em relação ao VEF1 inicial ou a uma dose cumulativa de metacolina de 2,048 se finalizava o desafio. A resposta era calculada como a área sob a curva entre o valor basal e o VEF1 final, por dose logarítmica (66):

$$\text{CDR-Metacolina} = \frac{\text{último VEF1} - \text{VEF1 basal}}{\text{logaritmo natural da última dose}}$$

Hiper-reatividade brônquica foi definida quando se obtinha valores de CDR-Metacolina abaixo do percentil 10 da distribuição de metacolina em um sub-grupo de

indivíduos saudáveis (como definido para o grupo que fez PFE, n=100). A resposta à metacolina também foi determinada pelo PD₂₀, como descrito previamente (67). Os resultados não foram diferentes quando se usou o PD₂₀ comparado com a CDR-Metacolina, e portanto não serão apresentados neste trabalho.

3.3.5. Definição dos Marcadores de Atopia

Os testes cutâneos alérgicos foram realizados tendo como base os extratos de alergenos comuns na área de Tucson. Aos 6 anos de idade testou-se a sensibilidade à poeira doméstica, grama bermuda, oliveira, alternaria, mesquita (árvore local) e “careless weed” (um tipo de erva daninha) e “mulberry” (amoreira). Aos 11 anos o *Dermatophagoides farinae* e pelo de gato foram adicionados às provas anteriores (alergenos fornecidos pelos laboratórios Holister-Stier, Everett, Washington, EUA). Testes cutâneos positivos foram definidos como pelo menos uma reação positiva (tamanho da endureção de 3mm ou mais, após a subtração do controle) em qualquer uma das 2 enquetes (6 ou 11 anos).

Sangue para a análise de IgE sérico foi obtido ao nascimento (cordão umbilical), à uma idade média de 9,3 meses, e novamente aos 6 e 11 anos. Níveis de IgE sérico total foram medidos através de teste com papel absorvente por radio-imuno ensaio (Pharmacia Diagnostics, Piscataway, New Jersey, EUA) (68).

3.3.6. Análise Estatística

Tabelas contingenciais e distribuição de χ^2 foram usados para a análise bivariável, e regressão logística foi utilizada para avaliação multivariada de variáveis dependentes dicotômicas. O intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para a razão de chances (RC) foram calculados com algoritmos comuns. A distribuição contínua dos níveis de IgE em cada enquête foi categorizada em quatro percentis e avaliadas quanto à sua associação com Amp%med e CDR-Metacolina usando um χ^2 para testar a tendência. Significância estatística foi definida como um nível alfa bicaudal de 5%.

3.3.7. Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Arizona. Os pais assinaram consentimento para que seus filhos participassem do estudo.

3.4. Resultados

3.4.1. População estudada

Das 655 crianças contatadas para teste de desafio com metacolina, 213 foram excluídas (78 por uso de medicações para asma nos 3 meses prévios aos testes, 93 por recusa ou não comparecimento, e 42 por IVAS ou IVAIs, cefaléia, problemas congênitos, ou outras doenças associadas) e 45 não fizeram o teste adequadamente, restando portanto 397 indivíduos com testes válidos. Das 676 crianças mandadas para casa com medidores de PFE, se obteve de volta 664 diários, dentre os quais 64 foram preenchidos inadequadamente. Um total de 350 crianças teve medidas de PFE e desafio à metacolina válidos; 303 crianças não tinham nenhum dos 2 testes. Não houve

diferença significativa na distribuição de sexo, altura, nível de educação materna, história materna de asma ou sibilância com IVAIs nos primeiros 3 anos de vida em crianças com testes de metacolina e PFE válidos, quando comparados com crianças que não fizeram os testes (Tabela 1). A prevalência de sibilância aos 11 anos de idade era significativamente menor no grupo de crianças que fez os testes de metacolina do que no grupo que fez PFE, principalmente devido à exclusão de crianças que necessitaram medicação para asma nos três meses anteriores ao teste no grupo da metacolina. Aos 11 anos o VEF1 basal era semelhante nos grupos que fizeram os 2 testes. As crianças do grupo que não fez nenhum dos testes eram um pouco mais velhas das que fizeram os testes. Havia 711 crianças que realizaram testes cutâneos alérgicos nas 2 enquetes, sendo que 68% apresentaram ao menos um teste cutâneo positivo.

3.4.2. Valores Normais: Amp%med e CDR-Metacolina

Os indivíduos foram classificados como tendo variabilidade de pico de fluxo expiratório (VPFE) se os valores de Amp%med eram maiores ou iguais ao ponto de corte de 16,6% (percentil 90 na população saudável de referência). Entre as crianças que fizeram desafio de metacolina, os que tinham um coeficiente menor que ou igual a

-0,403 ml/unidade dose logarítmica foram considerados como hiper-responsivos.

Tabela 1.

Características dos indivíduos que realizaram teste de pico de fluxo expiratório (PFE), teste de desafio à metacolina (Mtc) e dos indivíduos que não realizaram nenhum teste (grupo de referência) durante a enquete dos 11 anos de idade

	PFE	Mtc	Sem testes
Total indivíduos	600	397	303
Idade (anos)	10,8 **	10,7***	11,2
Sexo (masc.)	48,0%	48,2%	48,0%
Asma Materna	12,8%	8,6%	12,8%
Sibilância c/ IVAIs (≤ 3 anos)	39,8%	36,6%	37,2%
Sibilância (11 anos)	27,8%	19,9%*	25,0%
VEF1 basal (L/seg)	2,18(± 3,4)	2,18(± 3,3)	†
Teste cutâneo pos.	63,0%	65,1%	†

***p ≤ 0,001 **p ≤ 0,01 *p ≤ 0,05

Os grupos de crianças que fizeram testes de PFE e Mtc não são exclusivos. As diferenças estatísticas foram calculadas entre os grupos em relação ao grupo sem testes. Faltavam dados para algumas características de algumas crianças

†Um pequeno número de indivíduos foram testados neste grupo (27 com VEF1 e 79 com testes cutâneos), portanto as comparações não significavam muito.

3.4.3. Hiper-Responsividade à Metacolina e Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE) aos 11 Anos: Associação com Sibilância em Diferentes Idades, Testes Cutâneos Alérgicos e Gênero

A análise bivariada (Tabela 2) mostra que crianças com VPFE aos 11 anos já eram 2 vezes mais propensas a sibilar aos 3 anos de idade, comparadas às crianças que não tinham VPFE (RC: 1,9 e IC 95%: 1,1 a 3,3; $p < 0,05$). Também havia uma associação significativa entre VPFE positiva e sibilância aos 6 anos de idade (RC: 2,0 e IC 95%: 1,1 a 3,4; $p < 0,01$) mas não com sibilância aos 11 anos. Entre as crianças que fizeram PFE aos 11 anos, 57 tinham IVAS nas 4 semanas anteriores ao uso do medidor de PFE (não havia nenhuma criança com IVAI entre as crianças que fizeram PFE). Crianças com IVAIs à época da enquete dos 11 anos apresentavam uma maior prevalência de VPFE positiva naquela idade (RC: 2,1 e IC 95%: 1,0 a 4,5; $p < 0,05$) comparadas àquelas sem IVAIs. VPFE não estava associada a gênero ou teste cutâneo positivo. Ao contrário, teste de metacolina positivo estava associado à sibilância aos 11 anos (RC: 4,4 e IC 95%: 2,6 a 7,4; $p < 0,001$), mas não à sibilância aos 6 anos ou < 3 anos. Também se constatou um risco 4 vezes maior de teste de metacolina positivo em indivíduos com prova cutânea positiva, comparado a indivíduos com prova cutânea negativa (RC: 4,3 e IC 95% 2,7 a 7,8; $p < 0,001$). Meninos apresentavam um maior risco de apresentar hiper-responsividade à metacolina, comparado com meninas (RC: 2,3 e IC 95%: 1,4 a 3,7; $p < 0,001$).

Tabela 2.

Associação[†] de hiper-responsividade à metacolina (Mtc positiva) e variabilidade do pico de fluxo expiratório (VPFE positiva) aos 11 anos, com sibilância em diferentes idades, testes cutâneos positivos e sexo: Análise Univariada

		Mtc Positiva			VPFE positiva		
		N	%	RC (IC 95% CI) [†]	N	%	RC (95% CI) [†]
Sibilância ≤ 3a.	SIM	126	27,8	1,1 (0,6-1,7)	192	14,1	1,9 (1,1-3,3)*
	NÃO	218	26,6		322	8,1	
Sibilância aos 6a.	SIM	83	32,5	1,6 (0,9-2,6)	163	15,3	2,0 (1,1-3,4)**
	NÃO	312	23,4		427	8,3	
Sibilância aos 11	SIM	78	51,3	4,4 (2,6-7,4)***	166	13,9	1,6 (0,9-2,8)
	NÃO	314	19,4		431	9,0	
Teste Cutâneo	(+)	244	34,0	4,3 (2,4-7,8)***	372	9,7	0,9 (0,5-1,6)
	(-)	141	10,6		199	10,6	
Sexo	MASC.	192	33,9	2,3 (1,4-3,7)***	286	11,2	1,2 (0,7-2,0)
	FEM.	204	18,1		313	9,6	
IVAS ^{**}	SIM	---	---	---	57	17,5	2,1 (1,0-4,5)*
	NÃO	---	---	---	479	9,0	

***p ≤ 0,001 **p ≤ 0,01 *p ≤ 0,05

[†]RC (Razão de Chance), e IC 95% (Intervalo de Confiança de 95%)

^{**}IVAS: Infecções Respiratórias de Vias Aéreas Superiores aos 11 anos de idade; indivíduos com IVAS foram excluídos do desafio com metacolina

Análise de Regressão Logística (Tabela 3), tendo hiper-responsividade à metacolina e VPFE medidos aos 11 anos, como as variáveis dependentes, mostrou que somente sibilância aos 6 anos de idade era significativa e independentemente associada a VPFE medida aos 11 anos (RC: 2,1 e IC 95%:1,0 a 4,1; $p < 0,05$), após ajuste para sibilância em outras idades, provas cutâneas, gênero, e IVAS. Aos 11 anos de idade não eram independentemente associadas a VPFE positiva (Tabela 3). Contrariamente, hiper-responsividade à metacolina aos 11 anos estava associada à sibilância aos 11 anos (RC: 3,2 e IC 95%: 1,7 a 5,9; $p < 0,001$), testes cutâneos positivos (RC: 3,0 e IC: 1,6 a 5,6; $p < 0,001$), e ao gênero masculino (RC: 2,1 e IC: 1,2 a 3,5; $p < 0,05$). Hiper-responsividade à metacolina aos 11 anos não estava associada à sibilância às idades de <3 e 6 anos.

3.4.4. Hiper-Responsividade à Metacolina e Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE) aos 11 Anos: Associação com Grupos de Sibilantes aos 3 e 6 Anos

Para esta análise as crianças foram divididas em 4 grupos, de acordo com sua história de sibilância durante os 6 primeiros anos de vida (Tabela 4), como definido em um estudo anterior do grupo de Tucson (23). VPFE e hiper-responsividade à metacolina não foram associados aos “sibilantes transitórios precoces”, ou seja, crianças sibilando durante os 3 primeiros anos de vida, mas que já não estavam mais sibilando aos 6 anos de idade. VPFE medida aos 11 anos estava significativamente associada à sibilância aos 6 anos de idade (em crianças com teste cutâneo alérgico negativo que sibilavam aos 6 anos, mas não haviam sibilado abaixo dos 3 anos) (RC:3,3 e IC 95%: 1,3 a 8,8; $p < 0,01$). Hiper-responsividade à metacolina aos 11 anos

não estava relacionada a nenhum dos grupos de sibilantes até a idade de 6 anos, embora houvesse uma associação não significativa para o grupo de indivíduos com teste cutâneo positivo que sibilaram abaixo de 3 anos e aos 6 anos.

Tabela 3.

Associação entre hiper-responsividade à metacolina (Mtc positiva) e variabilidade ao pico de fluxo expiratório (VPFE) medidas aos 11 anos de idade, com sibilância em diferentes idades, testes cutâneos alérgicos e sexo: Análise de Regressão Logística Multi-variada

	Mch positiva (RC, IC 95%) [†]	PEFvar positiva (RC, IC 95%) [†]
Sibilância ≤ 3 ano	1,1 (0,6 – 1,9)	1,6 (0,9 – 2,9)
Wheeze age 6	0,9 (0,5 – 1,7)	2,1 (1,0 – 4,1)*
Wheeze age 11	3,2 (1,7 – 5,9)***	1,1 (0,5 – 2,4)
Positive skin test	3,0 (1,6 – 5,6)***	0,8 (0,4 – 1,5)
Gender (male)	2,1 (1,2 – 3,5)**	1,0 (0,6 – 2,0)
URIs ^{**}	---	0,9 (0,8-10,0)

*** $p \leq 0,001$ ** $p \leq 0,01$ * $p \leq 0,05$

[†]RC (Razão de Chance), e IC 95% (Intervalo de Confiança de 95%)

^{**}IVAS: Infecção de Vias Aéreas Superiores aos 11 anos de idade; indivíduos com IVAS foram excluídos do desafio com metacolina

Tabela 4.

Associação de hiper-responsividade à metacolina (Mtc positiva) e variabilidade de pico de fluxo expiratório (VPFE positiva) medidos aos 11 anos de idade, com sibilância aos < 3 e 6 anos^{†† †††}

	<i>Total</i>		<i>Teste cutâneo neg.</i>		<i>Teste cutâneo pos.</i>	
	<i>Mtc Pos.</i>	<i>VPFE Pos.</i>	<i>Mtc Pos.</i>	<i>VPFE Pos.</i>	<i>Mtc Pos.</i>	<i>VPFE Pos.</i>
Sem Sibil.3/Com Sibil.6						
% Positivo	26	7	14	8	32	6
N+/N grupo	49/188	19/262	10/71	8/105	36/113	9/145
RC (IC 95%) [†]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Com Sibil.3/Sem Sibil.6						
% Positivo	22	10	10	9	32	11
N+/N group	18/80	10/100	3/30	3/34	15/47	7/61
RC (IC 95%)	0,9(0,5-1,6)	1,4(0,6-3,2)	0,7(0,2-2,7)	1,1(0,3-4,6)	1,0(0,5-2,2)	2,0(0,7-5,8)
Sem Sibil.3/Com Sibil.6						
% Positiva	28	14	7	22	39	10
N+/N group	13/47	12/85	1/15	5/23	12/31	6/59
RC (CI 95%)	0,9(0,4-1,9)	2,1 (1,0-4,6) *	0,4(0,04-	3,3(1,0-12,5)*	1,2(0,5-2,9)	1,1(0,6-5,0)
Com Sibil.3/Com Sibil.6						
% Positiva	39	19	11	15	52	18
N+/N group	13/33	13/70	1/9	2/13	12/23	10/54
RC (IC 95%)	1,7(0,8-3,7)	2,8(1,3-6,2)	0,7(0,2-7,5)	2,5(0,4-13,7)	2,0(0,8-5,2)	3,3(1,3-8,8) **

** $p \leq 0,01$ * $p \leq 0,05$

† Razão de Chance em relação ao grupo de referência

† RC (Razão de Chance), e IC 95% (Intervalo de Confiança de 95%); Ajustado por Sexo e por IVAS

†† Grupos são os mesmos que os descritos no estudo prévio (ref. 23): Sem sibilância aos 3 anos ou aos 6 anos de idade (Sem Sibil. 3/ Sem Sibil. 6); Com sibilância aos 3 anos e sem sibilância aos 6 anos (Com Sibil. 3/ Sem Sibil. 6); Sem sibilância aos 3 anos de idade e com sibilância aos 6 anos de idade (Sem Sibil. 3/ Com Sibil. 6); e Com sibilância aos 3 e 6 anos de idade (Com Sibil. 3/ Com Sibil. 6)

†††Número total de indivíduos é maior do que os sub-totais de teste cutâneo positivo e teste cutâneo negativo, uma vez que nem todos os indivíduos tinham resultados para testes cutâneos

3.4.5. Hiper-Responsividade à Metacolina e Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE) aos 11 Anos: Associação com Grupos de Sibilantes aos 6 e 11 anos

Para esta análise as crianças também foram divididas em 4 grupos, de acordo com sua história de sibilância aos 6 e 11 anos (Tabela 5). Crianças com hiper-responsividade à metacolina aos 11 anos tinham maior chance de sibilar aos 11 anos, independente de estarem ou não sibilando aos 6 anos (RC: 2,5 e IC 95%: 1,1 a 5,7; $p < 0,05$ para crianças sem sibilos aos 6/com sibilos aos 11 e RC: 4,5 e IC 95%: 2,0 a 10,1; $p < 0,001$ para crianças com sibilos aos 6/com sibilos aos 11. VPFE também estava associada à sibilância persistente, ou seja, crianças sibilando aos 6 e 11 anos (RC: 2,3 e IC 95%: 1,2 a 4,5; $p < 0,01$). Ao contrário, crianças que tinham VPFE positivo aos 11 anos e apresentavam teste cutâneo alérgico negativo também tinham maior risco de ter sibilado aos 6 anos, mas não aos 11 (RC: 2,9 e IC 95%: 1,0 a 8,8; $p < 0,05$ para crianças com sibilos aos 6/sem sibilos aos 11).

3.4.6. Hiper-Responsividade à Metacolina e Variabilidade de Pico de Fluxo Expiratório (VPFE) aos 11 Anos: Associação com IgE Sérico Medido em Diferentes Idades

VPFE aos 11 anos não estava associada a níveis elevados de IgE em nenhuma das enquetes onde esta variável foi medida (Figura 1). Hiper-responsividade à metacolina medida aos 11 anos, porém, era marginalmente associada aos níveis de IgE sérica total no cordão umbelical (convertida para valores logarítmicos, $p < 0,07$) e altamente associada com níveis de IgE sérica medidas aos 6 ($p < 0,001$) e 11 anos ($p < 0,0001$).

Tabela 5.

Associação[†] de hiper-responsividade à metacolina (Mtc positiva) e variabilidade ao pico de fluxo expiratório (VPFE positiva) medidos aos 11 anos de idade, com sibilância aos 6 e 11 anos^{**} ^{***}

	<i>Total</i>		<i>Teste cutâneo neg.</i>		<i>Teste cutâneo pos.</i>	
	<i>Mtc Pos.</i>	<i>VPFE Pos.</i>	<i>Mtc Pos.</i>	<i>VPFE Pos.</i>	<i>Mth Pos.</i>	<i>VPFE Pos.</i>
Sem Sibil.6/ Sem Sibil.11						
% Positiva	21	52	8	8	32	8
N+/N grupo	56/268	29/356	13/153	12/150	35/108	12/150
RC (IC 95%) [†]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Com Sibil.6/ Sem Sibil.11						
% Positiva	11	13	4	19	18	8
N+/N grupo	5/46	9/70	1/23	6/31	4/22	3/37
RC (IC 95%)	0,4 (0,1-1,1)	1,6 (0,7-3,7)	0,3 (0,04-2,5)	2,9 (1,0-8,8) *	0,6(0,2-1,9)	1,0(0,3-3,7)
Sem Sibil.6/ Com Sibil.11						
% Positiva	42	10	1	10	48	9
N+/N grupo	17/40	7/68	1/8	1/10	15/31	5/56
RC (95% IC)	2,8 (1,4-5,6)**	1,3 (0,5-3,1)	1,0 (0,1-9,2)	1,3 (0,1-11,3)	2,5 (1,1-5,7)*	1,1(0,4-3,1)
Com Sibil.6/ Com Sibil.11						
% Positiva	59	17	–	20	65	15
N+/N grupo	22/37	16/93	0/2	1/5	22/34	13/85
RC (IC 95%)	5,1(2,4-10,6)**	2,3(1,2-4,5)**	–	2,9 (0,3-28,1)	4,5(2,0-10,1)***	1,9(0,9-4,4)

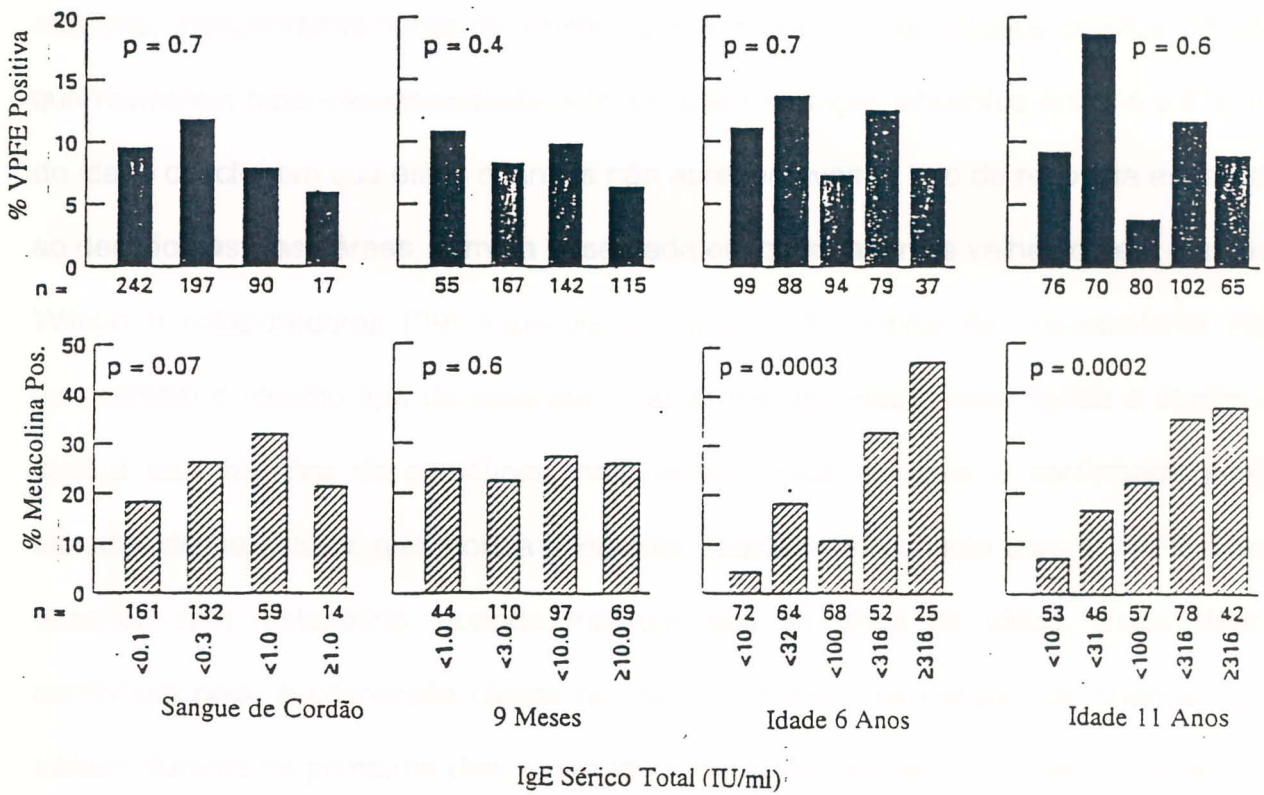
*** $p \leq 0,001$ ** $p \leq 0,01$ * $p \leq 0,05$ † Razão de Chance em relação ao grupo de referência

† RC (Razão de Chance), e IC 95% (Intervalo de Confiança de 95%); Ajustado por Sexo e por IVAS

** Grupos são os mesmos que os descritos no estudo prévio (ref. 23): Sem sibilância aos 3 anos ou aos 6 anos de idade (Sem Sibil. 3/ Sem Sibil. 6); Com sibilância aos 3 anos e sem sibilância aos 6 anos (Com Sibil. 3/ Sem Sibil. 6); Sem sibilância aos 3 anos de idade e com sibilância aos 6 anos de idade (Sem Sibil. 3/ Com Sibil. 6); e Com sibilância aos 3 e 6 anos de idade (Com Sibil. 3/ Com Sibil. 6)

***Número total de indivíduos é maior do que os sub-totais de teste cutâneo positivo e teste cutâneo negativo, uma vez que nem todos os indivíduos tinham resultados para testes cutâneos

Figura 1. Proporção de indivíduos com variabilidade de pico de fluxo expiratório (VPFE) ou resposta ao desafio à metacolina positiva, em relação aos níveis séricos de IgE (medidos em diferentes idades). O número de crianças testadas (n) em cada nível de IgE é mostrado sob as barras em cada um dos gráficos. Valores de P para tendência dentro dos grupos foram determinados através do teste do qui quadrado.



3.5. Discussão

Tanto a hiper-responsividade à metacolina quanto a variabilidade ao pico de fluxo expiratório medidos aos 11 anos de idade estavam associados à sibilância persistente durante o período escolar (aos 6 e 11 anos). O aumento na prevalência de VPFE também foi observado em um grupo de crianças predominantemente não atópicas que sibilavam aos 6 anos, mas não aos 11 anos de idade. Hiper-responsividade à metacolina estava associada à sibilância aos 11 anos em crianças atópicas, independentemente de sibilância aos 6 anos. Dois estudos prévios (39,69) que revisaram hiper-responsividade brônquica em crianças sibilantes entre 4 e 6 anos de idade concluíram que estas crianças não apresentavam o tipo de resposta esperada ao desafio das vias aéreas, como a observada em crianças mais velhas ou em adultos. Wilson e colaboradores (39) especularam que muitos sibilantes pré-escolares não apresentam o mesmo tipo de resposta inflamatória das vias aéreas ligada à atopia, a qual é característica de asmáticos mais velhos. Esta hipótese é confirmada pelos achados desse estudo, que mostra diferentes padrões de resposta para a VPFE e aos desafios com metacolina, quando medidos aos 11 anos de idade. Estes dados confirmam pois, a impressão clínica de que um número expressivo de crianças que sibilam durante os primeiros dias e a idade pré-escolar apresentam uma condição que é provavelmente diferente daquela encontrada em crianças mais velhas ou adultos, a qual se caracteriza por uma estreita relação entre asma e atopia. Estes achados e os relatados por Wilson e colaboradores (39) têm importantes consequências para o entendimento da sibilância na infância, a qual parece constituir um grupo heterogêneo

de condições com um desembocadouro final, representado clinicamente por obstrução recorrente das vias aéreas.

Os dados apresentados neste trabalho não nos permitem definir a origem da alteração na dinâmica das vias aéreas que possa existir em indivíduos não atópicos que apresentavam variabilidade de pico de fluxo expiratório aos 11 anos, sibilância aos 6 anos e nenhuma sibilância aos 11 anos de idade. A variabilidade do pico de fluxo expiratório não estava relacionada aos testes cutâneos alérgicos positivos medidos aos 6 e 11 anos e à IgE sérica medida no cordão umbelical, aos 9 meses, 6 anos e 11 anos de idade. Inversamente, a responsividade à metacolina era fortemente associada a testes cutâneos alérgicos positivos e à IgE sérica total aos 11 e 6 anos (Figura 1). Parece portanto, que responsividade à metacolina e variabilidade ao pico de fluxo expiratório identificam diferentes tipos de anormalidades de comportamento das vias aéreas (70). Isto está em concordância com os achados de Siersted e colaboradores (60,71), que mostraram que algumas crianças com sintomas relacionados à asma, mas sem o diagnóstico de asma haviam apresentado alta variabilidade de pico de fluxo expiratório, sem hiper-responsividade a metacolina. É tentador portanto, especular que talvez estímulos ambientais tais como vírus ou a fumaça de cigarro possam alterar a dinâmica das vias aéreas e causar uma síndrome de sibilância menos persistente, através de mecanismos que regulam a tonicidade das vias aéreas, independentemente de um processo inflamatório mediado por IgE.

Em trabalhos anteriores apresentados pelo grupo de Tucson, foi mostrado que o maior fator de risco nos “sibilantes transitórios precoces” (sibilância até os 3 anos de idade e não após) é uma função pulmonar diminuída, que pode ser detectada logo após o nascimento (28), mantendo-se neste mesmo patamar ao ser reexaminada aos 6 anos de idade (35). Neste estudo atual, se observou que este sub-grupo de crianças também não apresentava aumento na prevalência de hiper-responsividade à metacolina ou variabilidade ao pico de fluxo expiratório positiva, quando medidos aos 11 anos de idade. Parece portanto, que aumento de labilidade das vias aéreas não é o fator responsável principal pelos baixos níveis de função pulmonar observados nestas crianças. A diminuição de função pulmonar é mais provavelmente uma consequência de características mecânicas do pulmão tais como alteração da resistência das vias aéreas ou aumento na complacência dinâmica (72). O trabalho de Stick e colaboradores (73), assim como este trabalho, mostrou que crianças que sibilavam no início da vida apresentavam menores níveis de função pulmonar que crianças sem sibilância, mas que reponsividade brônquica à desafios com histamina não eram diferentes entre esses 2 grupos.

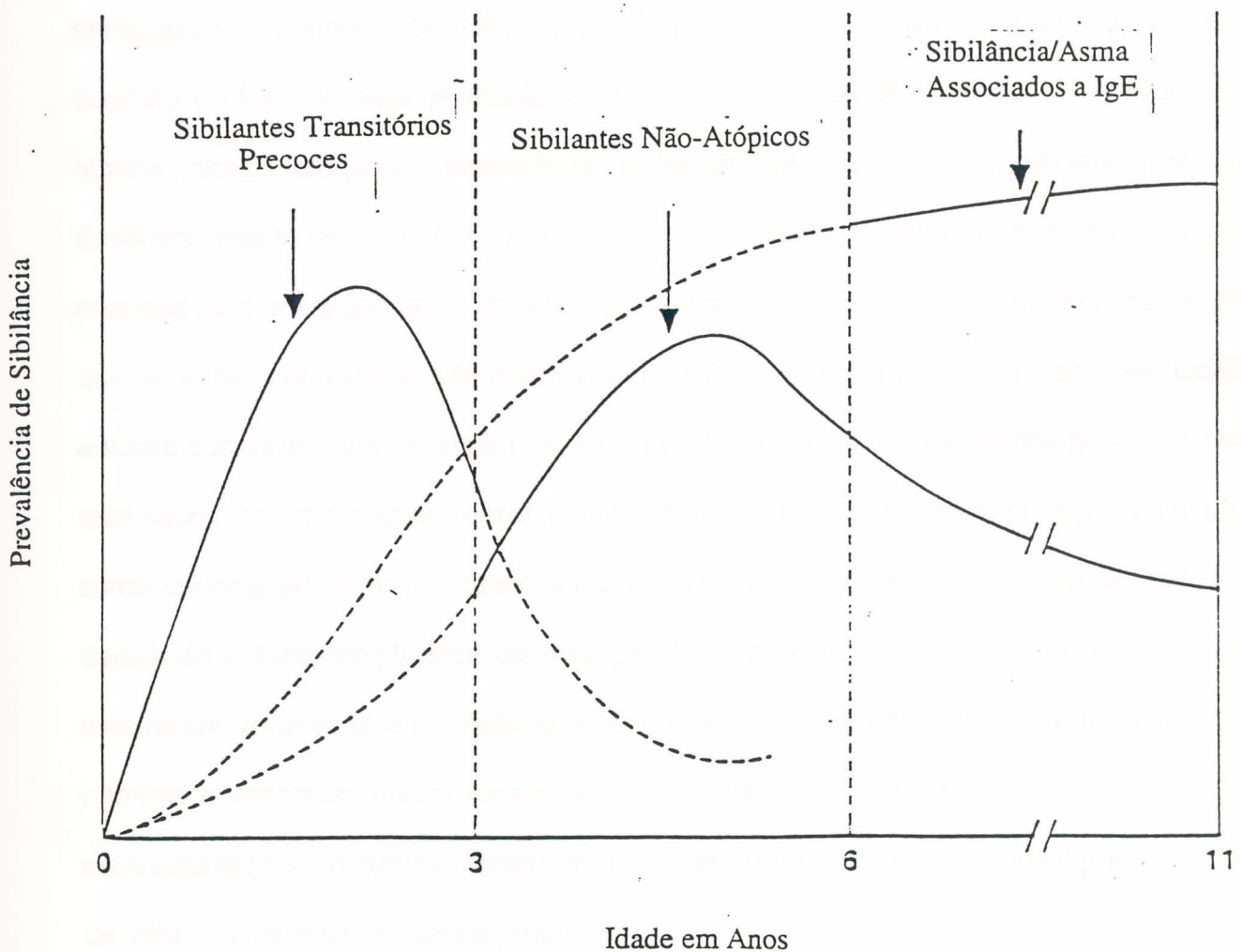
Há algumas limitações deste estudo que necessitam ser discutidas. Testes de desafio com metacolina não foram feitos em crianças com uma história significativa de sintomas asmáticos nos 3 meses anteriores. Dados mais recentes indicam que esta precaução exagerava os possíveis efeitos colaterais de desafios de metacolina em crianças com sintomas ativos de asma. A maior consequência dessa restrição é que indivíduos com sintomas mais graves (n=78) estão sub-representados no grupo testado

para metacolina (Tabela 1). Um análise mais criteriosa das possíveis consequências dessa restrição nos resultados do estudo indicam que nossas conclusões não seriam modificadas se tivessem sido incluídos os indivíduos com sintomas rescentes de asma. No caso, as associações entre metacolina e sibilância aos 11 anos, marcadores de atopia, gênero masculino, e asma corrente eram todas significativas entre os indivíduos incluídos no estudo e seriam provavelmente ainda mais fortes caso estes indivíduos não houvessem sido excluídos do estudo. Hiper-responsividade à metacolina era marginalmente associada à sibilância às idades de <3 e 6 anos de idade em indivíduos com testes cutâneos alérgicos positivos (Tabela 4). Esta associação seria ainda mais forte se os indivíduos com sintomas mais severos tivessem sido incluídos na análise, uma vez que este seria o grupo de maior risco para apresentar sibilância persistente. Estes critérios de exclusão não afetaram porém, os indivíduos que estavam sibilando aos 6 anos, mas não estavam sibilando aos 11 anos de idade, portanto a baixa prevalência de testes positivos de metacolina neste grupo não pode ser explicada por um viés de seleção. Finalmente, a variabilidade do pico de fluxo expiratório foi medida em todos os indivíduos que cooperaram, independentemente de sintomas, portanto não há qualquer viés em relação a sintomas neste grupo; mais ainda, os resultados foram similares quando a análise para variabilidade de pico de fluxo expiratório foi restringida ao grupo que também realizou os testes de desafio à metacolina.

Em resumo, existem pelo menos 3 diferentes fenótipos de sibilância associados a fatores de risco diferentes que coexistem durante os primeiros 11 anos de vida. Este estudo classifica estes fenótipos de sibilância na infância como: “sibilantes transitórios

precoces”, “sibilantes não atópicos” da idade pré-escolar e primeiros anos escolares, e “asma/sibilância ligados à atopia” (Figura 2). Estes fenótipos coincidem com os grupos de sibilantes da infância anteriormente descritos por Wilson e colaboradores (39). Os dados desse estudo sugerem que a primeira síndrome é principalmente associada a baixos níveis de função pulmonar que persistem baixos durante a infância (25), e o segundo grupo está principalmente associado a um aumento de variabilidade de pico de fluxo expiratório, anos após cessarem os sintomas respiratórios; no caso deste estudo, aos 11 anos de idade. Sibilância/asma associada à IgE, por outro lado, pode existir em qualquer idade durante a infância e está relacionada à atopia, aumento na responsividade à metacolina e aumento na variabilidade ao pico de fluxo expiratório, como previamente descrito em pacientes mais velhos com asma crônica.

Figura 2. Prevalências anuais hipotéticas de sibilância, para os três fenótipos de sibilância na infância. Prevalência para cada intervalo etário seria calculado como a soma das áreas sob cada curva. A classificação dos fenótipos de sibilância também não implica que os grupos sejam exclusivos. Linhas pontilhadas indicam que a sibilância poderia apresentar curvas de formato diferente devido a diferentes fatores, inclusive por superposição dos grupos. (modificado de Wilson NE, et cols., ref. 39).



4. PESQUISA 2: IgE Sérico Total e Sua Associação com Fenótipos de Sibilância e Sensibilização Alérgica em Crianças (Anexo 2)

4.1. Introdução

Mesmo que vários estudos tenham mostrado existir uma forte associação de níveis de IgE sérico total (67,74,75,76) e reatividade de testes cutâneos à aeroalergenos (51,77,78,79) em relação à prevalência de asma, a natureza dessa associação ainda não é bem entendida. Se propôs, por exemplo, que a produção não cognata de IgE, ou seja, produção de IgE que não é desencadeada por um ou por alguns poucos alergenios específicos, seria um fator de risco significativo para o desenvolvimento de asma (77). Burrows e colaboradores mostraram recentemente que crianças com um diagnóstico de asma têm níveis de IgE sérico total muito maiores do que se esperaria, comparado aos níveis de IgE observado nos seus pais (74). Estes autores sugeriram que os altos níveis de IgE observados nos asmáticos poderiam ser explicados, de uma maneira geral, pela tendência dos asmáticos em produzir mais IgE, como consequência do processo inflamatório que ocorre nas suas vias aéreas. Os dados do estudo longitudinal de doenças respiratórias em crianças de Tucson (23) mostraram também que crianças que irão desenvolver sibilância persistente durante a infância apresentam níveis elevados de IgE desde os primeiros momentos de vida, contrastando com o que acontece com crianças que sibilam apenas nos primeiros anos de vida (“sibilantes transitórios precoces”).

Estudos recentes feitos por Peat e colaboradores (51) forneceram mais dados para se entender as complexas relações entre reatividade a testes cutâneos alérgicos e incidência de asma. Estes autores mostraram que sensibilização precoce (antes dos 8 anos de idade) a alérgenos ambientais comuns estava associada a um maior risco de desenvolvimento de hiper-reatividade bronquial e asma, enquanto que sensibilização depois desta idade não mostrava nenhuma destas relações. Dados preliminares do estudo longitudinal da população adolescente e adulta de Tucson (Sherril D, Stein RT e cols, Anexo 4) confirmam estes achados e indicam que sensibilização alérgica tardia estava associada a baixos níveis de de IgE quando comparada com sensibilização precoce. Estes resultados levam a crer que métodos de análise longitudinais são necessários para que se determine melhor as relações complexas entre o momento em que ocorre a sensibilização alérgica, o aumento da IgE sérica total nos primeiros anos de vida e os diferentes fenótipos de sibilância da infância.

Uma vez que IgE sérico total está fortemente relacionado à sensibilização alérgica e asma na infância (74-77), este estudo examinará como IgE sérico total (a variável dependente) se transforma temporalmente, em relação à sensibilização alérgica aos 6 e 11 anos de idade, e em relação aos diferentes padrões de sibilância durante a infância.

4.2. Hipóteses

Se espera neste estudo que IgE sérico total apresente diferentes níveis, de acordo com os diferentes fenótipos de sibilância na infância. Crianças com o fenótipo de sibilância persistente teriam um nível de IgE mais alto, comparado com os não sibilantes e com crianças que só sibilam nos primeiros anos de vida.

Também se espera que crianças sensibilizadas precocemente, sibilando desde cedo na vida e que se mantêm sibilando anos mais tarde apresentem os níveis de IgE mais altos.

4.3. Objetivos

4.3.1. Geral

Verificar a história de evolução natural de IgE sérico total em relação aos diferentes padrões de sibilância da infância e ao tempo de positividade de testes cutâneos à aero-alérgenos ambientais comuns.

4.3.2. Específicos

- a) Descrever os níveis de IgE sérico total nas diferentes idades em que foi estudado.
- b) Descrever a resposta ao testes cutâneos alérgicos nas duas ocasiões em que estes foram realizados.
- c) Descrever a frequência dos sintomas respiratórios (i.e. sibilância) nas três enquetes utilizadas para esta análise.
- d) Descrever a associação entre IgE sérico total e sensibilização aos testes cutâneos.

- e) Descrever a associação entre IgE sérico total e os fenótipos de sibilância.
- f) Descrever a associação entre IgE sérico total, fenótipos de sibilância e sensibilização a testes cutâneos.

4.4. Materiais e Métodos

4.4.1. População estudada

As crianças participantes do Estudo Pediátrico de Doenças de Tucson (5), incluídas no seguimento, de maio de 1980 a outubro de 1984, eram todas elegíveis para esta análise. Os pais eram clientes de uma empresa de medicina de grupo ("Group Health Associates") em Tucson, Arizona, EUA, e foram contactados a participar do estudo logo após o nascimento das crianças. Se obteve consentimento para 1246 recém-nascidos participarem do estudo. Crianças seleccionadas para esta análise necessitavam ter ao menos uma medida de IgE e haver respondido às questões sobre problemas respiratórios nas 3 enquetes realizadas. Na seção 3.3.1 está descrito em maior detalhe o delineamento geral deste estudo.

4.4.2. Análise de IgE Sérico Total

Níveis de IgE sérico total foram obtidos através de sangue coletado nas enquetes de 1 ano de vida, 6 anos e 11 anos. O soro foi congelado a -80° C até que fosse analisado, e níveis de IgE foram medidos por teste com papel absorvente por radio-imuno ensaio (PRIST) usando provas comercialmente disponíveis (Pharmacia Diagnostics, Piscataway, NJ, EUA). Como previamente descrito (68), o limiar de sensibilidade desta prova era de 0,1 IU/ml. Cada amostra era analisada em duplicata e

a média dos 2 valores de IgE servia com valor final. Uma vez que a distribuição dos valores de IgE tendem a ser fortemente desviada (80), eles foram transformados para valores logarítmicos para este estudo. As tabelas com os resultados de análises de IgE são apresentadas em valores logarítmicos (ln) médios.

4.4.3. Testes Cutâneos Alérgicos

Durante as enquetes dos anos 6 e 11 as crianças foram testadas para alérgenos ambientais comuns da área de Tucson (mistura de poeira domiciliar, gramínea Bermuda, amoreira, “mesquite” (uma árvore local), “careless weed” (erva daninha), e Alternaria); histamina e um controle, que consistia de 50% glicerina também foram aplicados. O tamanho da enduração era calculado como a soma em milímetros de 2 diâmetros que se cruzavam em ângulos retos.

Os indivíduos eram considerados com teste cutâneo positivo se em qualquer das enquetes apresentavam enduração maior de 2mm (ou ≥ 3) após subtraído o valor do controle. Crianças que tinham teste cutâneo positivo aos 6 anos foram classificadas como sensibilizados precoces, enquanto as que tinham teste negativo aos 6 anos e positivo aos 11 foram classificadas como sensibilizados tardios. Crianças que não foram testadas aos 11 anos, mas tinham teste cutâneo negativo aos 6 anos foram excluídas da análise.

4.4.4. Sintomas Respiratórios

Os questionários contendo perguntas sobre problemas respiratórios foram preenchidos durante as enquetes dos 3 anos, 6 anos e 11 anos. Entre várias perguntas, os pais foram questionados sobre se “as crianças tinham chiado ou sibilos no peito mesmo quando não estavam gripadas” e qual a frequência da sibilância. Quando as crianças haviam tido pelo menos um episódio de sibilância no ano anterior se considerava estas crianças sibilantes correntes naquela enquete. Neste estudo (diferentemente das classificações usadas na Pesquisa 1) se definiram 4 diferentes fenótipos para sibilância. Crianças que estavam sibilando durante a enquete do ano 3 e não sibilaram depois foram classificadas como “sibilantes precoces”; crianças que não estavam sibilando na enquete do ano 3, mas começaram a sibilar aos 6 ou 11 anos foram considerados “sibilantes tardios”; crianças que sibilaram em todas as 3 enquetes foram considerados “sibilantes persistentes” e os que não sibilaram em nenhuma das enquetes foram considerados “sem sibilância”. Crianças que não responderam às questões de sibilância em todas as 3 enquetes foram excluídas das análises.

4.4.5. Métodos Estatísticos

Os dados longitudinais de IgE foram estudados através de análise de medições repetidas. Uma vez que havia observações faltando, isto era feito através de um modelo de efeitos ao acaso (“random effects model”, REM). Recentemente Jones e cols. (81,82) demonstraram como o procedimento com o REM, o qual é geralmente utilizado para dados longitudinais contínuos espaçados desigualmente, pode ser utilizado para dados igualmente espaçados através de um “modelo saturado”. O

modelo saturado usa polinômios com uma ordem a menos que o número de pontos para cada sub-grupo. Para os dados deste estudo isto significa que se utilizará polinômios quadráticos ou de segunda ordem, uma vez que existem 3 pontos temporais (3 enquetes). Um modelo saturado permite que todos os pontos para cada sub-grupo tenham um valor médio diferente. O teste de razão de verossimilhança ("likelihood ratio") o qual foi calculado como a diferença de $-2\ln$ entre estes 2 modelos aninhados, foi usado para testar diferenças significativas entre interações de grupos e grupos por tempo. Para testar, por exemplo, se os valores médios de IgE de sibilantes persistentes apresentavam um padrão temporal diferente do grupo de referência, um modelo adequando os 2 grupos com polinômios quadráticos seria comparado com um modelo reduzido onde o grupo de referência seria ajustado com um polinômio quadrático e os sibilantes persistentes seriam ajustados com um modelo contendo somente um termo de interseção. Aqui, um aumento significativo de $-2\ln$ ("likelihood") entre estes 2 modelos indicaria que sibilantes persistentes apresentam uma interação de grupo por tempo ou um padrão temporal diferente do grupo de referência. Se esta diferença não era significativa, mas se o coeficiente de interseção estimado para os sibilantes persistentes era significativamente diferente, isto implicaria que os 2 grupos tivessem padrões temporais similares nos seus valores médios de IgE, mas que os sibilantes persistentes variassem por um valor constante a cada ponto de tempo. O coeficiente de interseção seria então uma estimativa dessa diferença, que seria chamada de uma diferença significativa entre grupos.

Os dados de IgE foram analisados separadamente em 3 medições repetidas. A primeira (Modelo 1) incluiu apenas as variáveis de sensibilização alérgica cutânea, a segunda (Modelo 2) incluiu apenas os fenótipos de asma, e a terceira (Modelo 3) combinava sensibilização e os fenótipos de asma e variáveis incluindo as possíveis interações entre essas duas variáveis básicas. Uma vez que sensibilização alérgica e sibilância não foram avaliados durante as mesmas enquetes em que se avaliou IgE, elas foram incluídas na análise de REM como co-variáveis fixas. Em outras palavras, elas só poderiam ter sido incluídas como co-variáveis tempo-dependentes se tivessem sido avaliadas ao mesmo tempo que a IgE sérica. Uma vez que se estudou apenas 3 pontos de tempo as categorias sibilância e sensibilização eram exaustivas (i.e. abrangiam todas as possíveis combinações). Resultados das análises com REM são apresentadas como médias e desvios padrão da média, ao invés dos coeficientes, o que torna sua interpretação um pouco mais difícil. Se utilizou testes bi-caudais para as hipóteses estatísticas, com um nível de significância alfa de 0,05.

Três formas diferentes de estruturas de co-variância entre indivíduos foram consideradas para cada análise de REM: auto-regressiva de primeira ordem, não correlacionada ou independente, e "toplitz". A estrutura de melhor ajuste era determinada através do critério de informações de Aikiki (AIC) com um modelo saturado. Para todas as análises a estrutura de co-variância não-correlacionada forneceu o melhor ajuste.

Uma vez que se sabe que a prevalência de sibilância e os níveis de IgE são diferentes de acordo com o sexo dos indivíduos (79), a análise inicialmente foi estratificada por sexo. Se no entanto os resultados estratificados fossem similares para ambos os sexos, os 2 grupos eram combinados e uma variável de sexo incluída, para que se obtivesse maior poder estatístico.

4.4.6. Aspectos Éticos

Este ítem já foi discutido na seção 3.3.7 e segue as mesmas normas do estudo anterior.

4.5. Resultados

Um total de 263 meninos e 277 meninas preencheram os critérios de inclusão para a análise, com pelo menos uma dosagem de IgE e respostas aos questionários nas enquetes selecionadas. A Tabela 6 (Tabela 1 do Anexo 2) mostra os dados descritivos destes indivíduos. As idades médias entre meninos e meninas eram semelhantes, com idades médias ao redor de 1, 6 e 11 anos de idade nas enquetes onde IgE foi medida. O número de meninos sensibilizados precocemente era maior do que o de meninas ($p < 0,002$) e os meninos também apresentavam mais sintomas de sibilância tardia e persistente que meninas ($p < 0,05$). O número de indivíduos que tinham sibilância persistente ou tardia e eram sensibilizados tardiamente era muito pequeno (de 3 a 9). Mais ou menos 30% do total de crianças do estudo tinham 1 ou 3 medições de IgE, e não havia diferenças significativas no número de observações entre meninos e meninas.

4.5.1. Associação Entre IgE e Testes de Sensibilização Cutâneos

Os resultados do ajuste do Modelo 1 aos dados de IgE são mostrados na Tabela 7 (Tabela 2 do Anexo 2) e ilustrados na Figura 3 (Figura 1 do Anexo 2). Os valores médios de IgE aumentaram com a idade em todos os grupos classificados através do tipo de sensibilização cutânea a alérgenos comuns (i.e. não sensibilizados, sensibilizados precoces, e sensibilizados tardios). Meninos que foram sensibilizados, seja precoce ou tardiamente, apresentavam níveis médios de IgE quando comparados a meninos não sensibilizados em todas as idades (Figura 3). Um achado interessante foi que os níveis de IgE em meninos eram significativamente maiores nos 2 sub-grupos com sensibilização positiva desde a idade de 1 ano, quando comparados com os não sensibilizados. Quando IgE foi novamente medida aos 6 e 11 anos, meninos sensibilizados precocemente apresentavam níveis de IgE significativamente maiores que os sensibilizados mais tarde nas 2 idades. Entre as meninas (Figura 3), não havia diferença entre o valor médio de IgE em relação à sensibilização com 1 ano de idade. Apenas as crianças sensibilizadas precocemente apresentavam níveis de IgE significativamente elevados ($p < 0,05$) aos 6 anos, comparadas às não sensibilizadas. Aos 11 anos os sub-grupos de crianças sensibilizadas precoce ou tardiamente apresentavam IgE elevado, quando comparados aos não sensibilizados. Aos 11 anos meninas sensibilizadas precoce ou tardiamente tinham níveis de IgE elevados, comparadas com as não sensibilizadas. Meninas sensibilizadas precocemente tinham níveis médios de sensibilização significativamente maiores que as sensibilizadas mais tardiamente. Outra diferença entre meninos e meninas foi que meninos apresentavam níveis de IgE significativamente maiores que meninas em todas as idades ($p < 0,02$).

Tabela 6. Dados estatísticos descritivos para os indivíduos que tiveram ao menos uma avaliação de IgE sérico e que sibilância foi avaliada em todas as três enquetes

	MENINOS	MENINAS
N TOTAL	263	277
IDADE (anos)*		
ENQUETE ANO 1	0,84 ± 0,21	0,88 ± 0,24
ENQUETE ANO 6	6,10 ± 0,58	5,98 ± 0,66
ENQUETE ANO 11	10,68 ± 0,46	10,74 ± 0,46
SEGUIMENTO TOTAL (anos)*	5,75 ± (4,39)	5,45 ± 4,48
No. MÉDIO OBSERVAÇÕES*	1,95 ± 0,77	1,90 ± 0,78
SENSIBILIZAÇÃO†		
PRECOCE**	103 (39,2)	73 (26,4)
TARDIA	36 (13,7)	34 (12,3)
SIBILÂNCIA†		
NUNCA**	115 (43,7)	171 (61,7)
PRECOCE	29 (11,0)	25 (9,0)
TARDIA**	73 (27,8)	56 (20,2)
PERSISTENTE**	46 (17,5)	25 (9,0)
INTERAÇÕES		
SENSIBILIZAÇÃO TARDIA		
- por Sibilância Tardia	9 (3,4)	8 (2,9)
- por Sibilância Persistente	3 (1,1)	5 (1,8)
SENSIBILIZAÇÃO PRECOCE		
- por Sibilância Tardia	24 (9,1)	34 (12,3)
- por Sibilância Persistente	13 (4,9)	30 (10,8)
No. COLETAS de IgE		
Uma Amostra	32%	35%
Duas Amostras	40%	38%
Três Amostras	28%	27%

* Média ± Desvio Padrão

† Contagem (percentual)

** Qui Quadrado $p < 0,05$

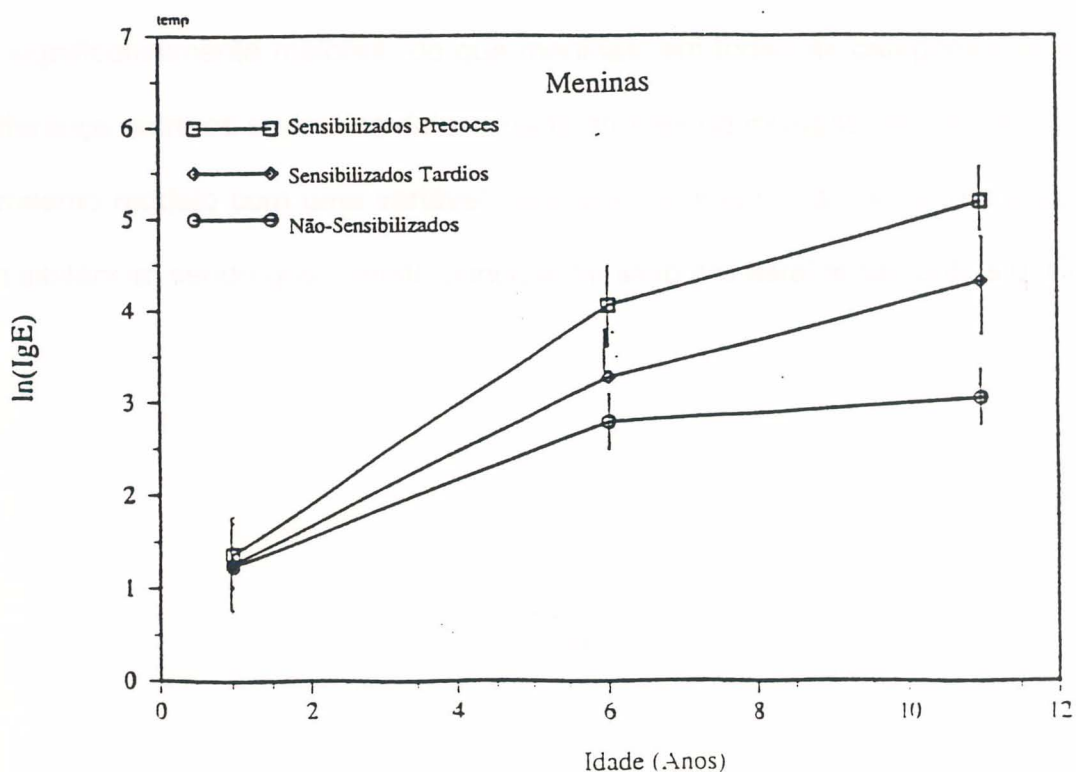
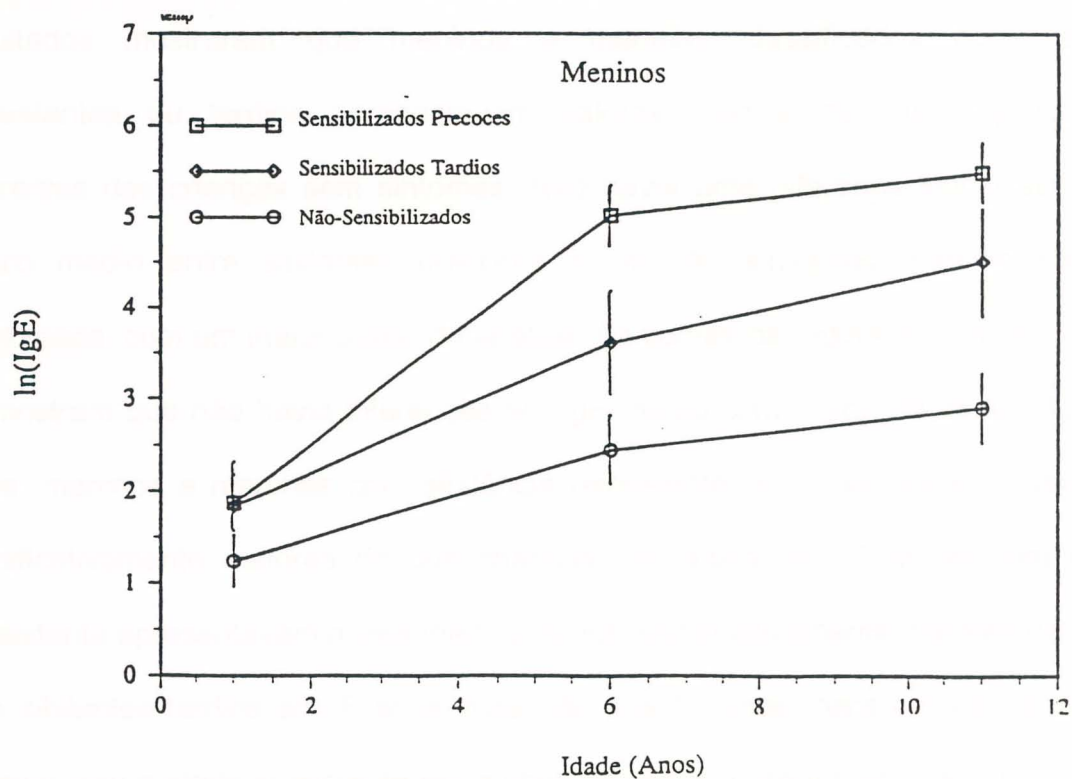
Tabela 7. Média e desvio padrão da média do log. de IgE em relação à sensibilização cutânea alérgica*

	ENQUETE ANO 1	ENQUETE ANO 6	ENQUETE ANO 11
MENINAS-Sens.			
NENHUMA	1,23 ± 0,11	2,78 ± 0,15	3,04 ± 0,15
TARDIA †	1,27 ± 0,25	3,27 ± 0,29	4,31 ± 0,28
PRECOCE †	1,36 ± 0,17	4,05 ± 0,21	5,18 ± 0,19
MENINOS-Sens.			
NENHUMA	1,25 ± 0,14	2,45 ± 0,18	2,91 ± 0,19
TARDIA †	1,84 ± 0,24	3,61 ± 0,28	4,50 ± 0,29
PRECOCE †	1,87 ± 0,15	5,02 ± 0,17	5,49 ± 0,16

† - Diferenças estatisticamente significativas entre grupos e grupos por tempo, quando comparados com crianças não sensibilizadas.

• - Comparações estatísticas feitas com o Modelo 1 do REM (ver métodos estatísticos, Pesquisa 2, para maiores detalhes).

Figura 3. IgE médio e intervalo de confiança de 95% para o Modelo 1, usando a análise de medições repetidas ("Random effects model", REM) para meninos e meninas. Crianças foram consideradas sensibilizadas quando elas têm pelo menos um teste cutâneo positivo aos 11 anos de idade. Crianças não sensibilizadas tinham provas cutâneas negativas nas 2 testagens (população de referência)



4.5.2. Associação Entre IgE e os Fenótipos de Sibilância:

O Modelo 3 observado na Tabela 8 (Tabela 3 do Anexo 2) mostra os resultados estratificados da análise de REM para os fenótipos de sibilância. Como os padrões temporais eram similares para ambos os sexos, neste modelo os dados para meninos e meninas foram agrupados com a inclusão de de uma variável única de sexo. Os resultados mostraram que meninos e meninas classificados como sibilantes persistentes ou tardios apresentavam valores médios de IgE significativamente diferentes das crianças sem sintomas. Não havia uma diferença significativa do IgE sérico médio entre sibilantes precoces e os não sibilantes, mesmo na análise combinada, com um maior poder de análise. As curvas na Figura 4 (Figura 2 do Anexo 2) mostram que não havia diferenças em IgE médio com 1 ano de idade. Aos 6 e 11 anos, meninos e meninas com sibilância persistente ou tardia tinham níveis de IgE significativamente maiores do que crianças não sibilantes. Crianças com sibilância persistente apresentavam níveis médios de IgE significativamente maiores ($p < 0,05$) do que sibilantes tardios aos 6 anos, mas não aos 11 anos, para ambos os sexos. IgE variava com a idade igualmente em ambos os sexos, porém meninos tinham níveis de IgE significativamente maiores do que meninas, em todas as categorias de sibilância. A diferença entre os sexos era determinada através da inclusão de meninos e meninas no mesmo modelo com uma variável para sexo e uma outra com a interação de sexo com sibilância, sendo que o efeito principal de sexo era estatisticamente significativo.

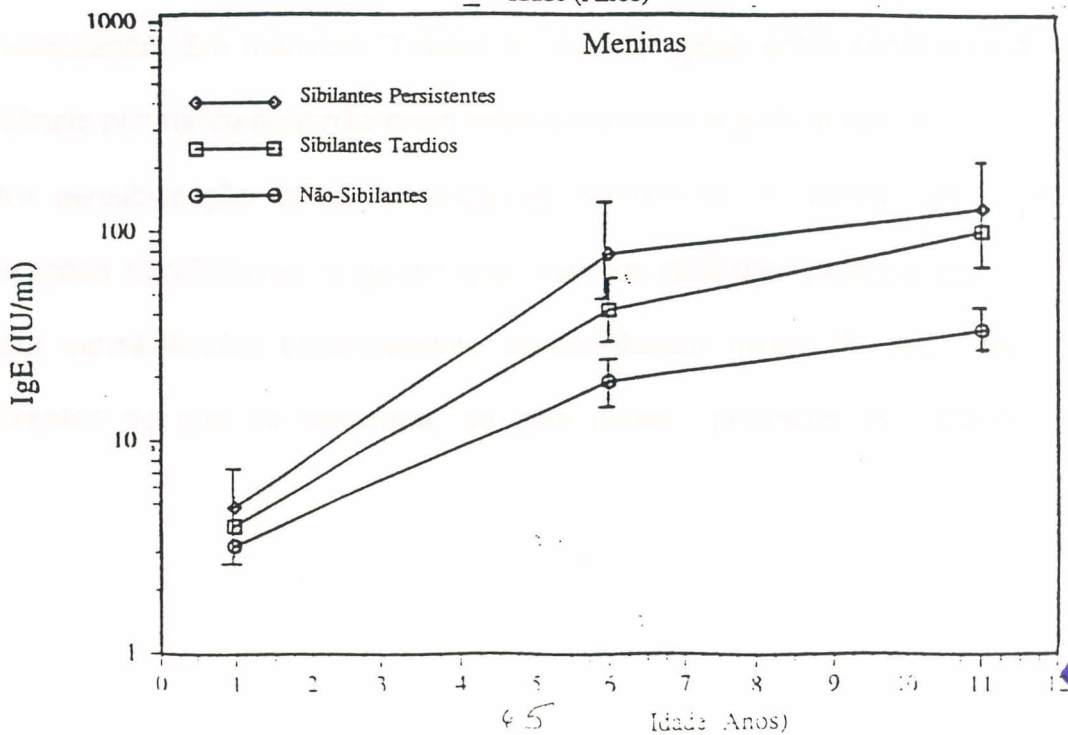
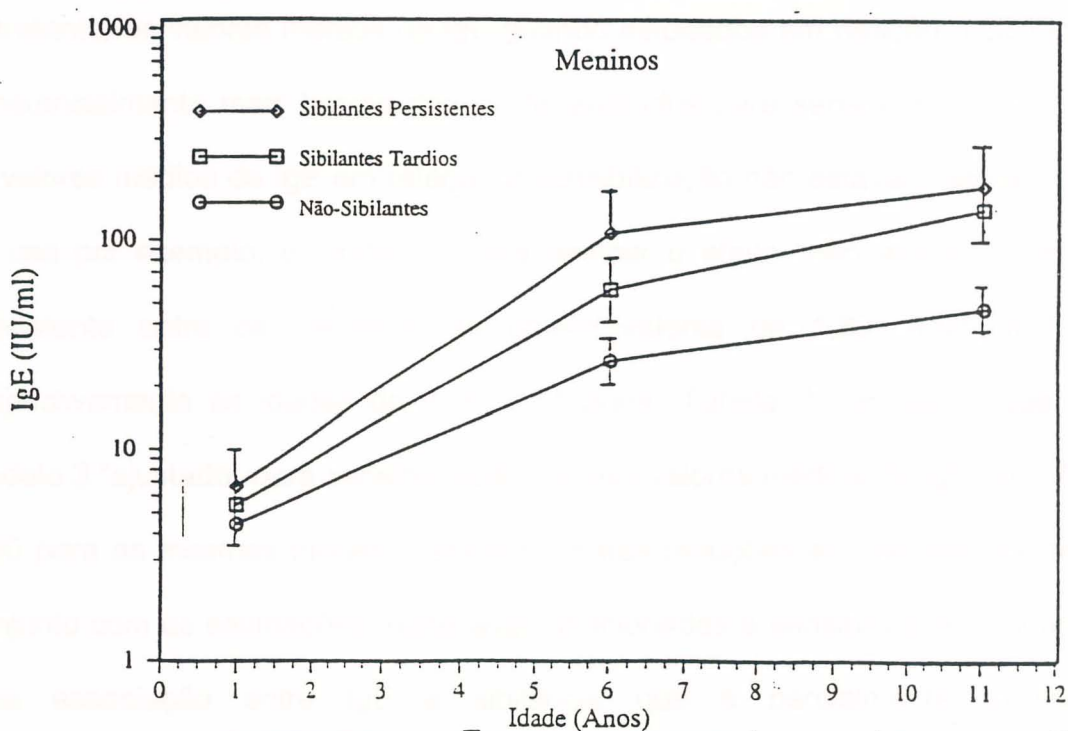
Tabela 8. Média e desvio padrão da média para log. de IgE em relação aos fenótipos de sibilância.*

	ENQUETE ANO 1	ENQUETE ANO 6	ENQUETE ANO 11
MENINAS-SIBILÂNCIA			
NENHUMA	1,16 ± 0,11	2,96 ± 0,13	3,54 ± 0,12
PRECOCE	0,85 ± 0,20	2,67 ± 0,21	3,25 ± 0,21
TARDIA †	1,37 ± 0,16	3,75 ± 0,25	4,62 ± 0,18
PERSISTENTE †	1,57 ± 0,21	4,37 ± 0,25	4,87 ± 0,25
MENINOS-SIBILÂNCIA			
NENHUMA	1,48 ± 0,11	3,28 ± 0,13	3,86 ± 0,13
PRECOCE	1,19 ± 0,20	3,00 ± 0,21	3,58 ± 0,20
TARDIA †	1,69 ± 0,15	4,07 ± 0,18	4,94 ± 0,18
PERSISTENTE †	1,89 ± 0,20	4,68 ± 0,24	5,19 ± 0,24

† - Diferenças estatisticamente significativas entre grupos e grupos por tempo, quando comparados com crianças não sibilantes.

* - Comparações estatísticas feitas com o Modelo 2 do REM (ver métodos estatísticos, Pesquisa 2, para maiores detalhes).

Figura 4. IgE médio e intervalo de confiança para o Modelo 2, usando a análise de medições repetidas ("Random effects model", REM) para meninos e meninas. Crianças foram consideradas sibilantes persistentes se elas sibilaram em todos as três enquetes (anos 1, 6 e 11), e sibilantes tardios se elas iniciaram a sibilância aos 6 ou 11 anos de idade, mas não antes disso. Crianças que sibilaram apenas na enquete do ano 1 e não após (sibilantes precoces) não eram estatisticamente diferentes da população de referência e portanto os dados desses dois grupos foram combinados



4.5.3. Associação Entre IgE, Sibilância e Testes de Sensibilização Cutâneos

Os resultados do ajuste do modelo 3 são mostrados nas Tabelas 9 e 10 (Tabelas 4 e 5 do Anexo 2). Este modelo foi utilizado para determinar se os efeitos estudados separadamente nos modelos 1 e 2 eram realmente independentes ou se eles apresentavam relações sinérgicas. Os efeitos principais de sibilância e sensibilização que eram estatisticamente significativos na análise independente para meninos, continuaram tendo significância estatística na análise combinada (Tabela 9). Entretanto, os valores médios de IgE quando estudados em relação à sibilância, eram substancialmente mais baixos depois de ajustados para sensibilização enquanto que os valores médios de IgE em relação à sensibilização não estavam alterados. Quando se usa por exemplo, o modelo 2 para estimar o efeito “não ajustado” de sibilância persistente entre os meninos, se obtém valores de 1,89, 4,68, e 5,19, para respectivamente as idades de 1, 6 e 11 anos (Tabela 8), enquanto que o uso do modelo 3 “ajustado” para sensibilização, obteve valores médios de IgE de 1,74, 2,92, e 3,20 para as mesmas idades (Tabela 9). Estas reduções em estimativas médias, em conjunto com as estimações inalteradas relacionadas à sensibilização, sugerem existir uma associação entre IgE e sibilância que é parcialmente explicada pela sensibilização. Em meninos (Tabela 9), as interações entre sensibilização precoce e sibilância persistente ou tardia eram estatisticamente significativas, enquanto a interação entre sensibilização tardia e sibilância persistente ou tardia não o eram. Estas interações significativas, sugerem que meninos sibilantes persistentes ou tardios, que foram sensibilizados precocemente apresentavam níveis de IgE médio que eram diferentes do que se esperaria, se eles fossem previstos em relação aos efeitos

principais de sensibilização e sibilância isoladamente (modelos 1 e 2). Um outro fato importante é que meninos sensibilizados precocemente apresentavam níveis de IgE tão altos quanto sibilantes persistentes (Figura 5 - Figura 3 do Anexo 2). O IgE médio de meninos sensibilizados precocemente e classificados como sibilantes persistentes não era muito diferente do IgE de sibilantes persistentes com 1 ano de idade, mas era substancialmente mais elevado aos 6 anos, mantendo-se estável depois desta idade.

Os resultados do ajuste do modelo 3 para as meninas (Tabela 10) mostrou que após ajustados para sensibilização, os efeitos principais de sibilância não eram mais estatisticamente significativos e a interação de sensibilização precoce e sibilância persistente era marginalmente significativa ($p=0,06$). O gráfico com estes resultados (Figura 5) mostra que as alterações em IgE entre as idades de 1 e 6 anos para meninas sibilantes e sensibilizadas precocemente não eram tão dramáticas como as observadas em meninos, mas aos 11 anos os valores de IgE neste grupo de meninas era comparável ao encontrado em meninos. Meninas com sibilância persistente e sensibilizadas precocemente apresentavam níveis de IgE maiores que os outros sub-grupos, em todas as idades, e esta diferença era estatisticamente significativa a 1 ano de idade ($p < 0,02$), quando baseada em uma comparação de um único ponto temporal. Os valores de IgE médio neste sub-grupo comportam-se similarmente ao que se observava com os meninos. Nenhuma outra interação foi significativa entre as meninas. Como observado para os meninos, os valores médios de IgE estimados para sensibilização ficavam inalterados com a inclusão de fenótipos de sibilância nesta análise, enquanto que os para sibilância ficavam reduzidos.

Tabela 9. Média e desvio padrão da média do log. de IgE, de sibilância e sensibilização à testes cutâneos alérgicos (como efeitos principais) em relação à interação de sibilância e sensibilização em meninos**

	ENQUETE ANO 1	ENQUETE ANO 6	ENQUETE ANO 11
-EFEITO PRINCIPAL-			
SIBILÂNCIA: Nunca	1,09 ± 0,16	2,28 ± 0,20	2,55 ± 0,20
Precoce	0,86 ± 0,26	2,07 ± 0,28	2,34 ± 0,28
Tardia †	1,50 ± 0,23	2,95 ± 0,36	4,00 ± 0,35
Persistente *	1,74 ± 0,34	2,92 ± 0,37	3,20 ± 0,36
SENSIBILIZAÇÃO:			
Precoce †	2,00 ± 0,25	4,76 ± 0,28	5,38 ± 0,25
Tardia †	1,69 ± 0,28	3,35 ± 0,35	4,10 ± 0,34
-INTERAÇÕES-			
SENSIBIL. PRECOCE			
X Sibilância Tardia †	1,68 ± 0,27	5,12 ± 0,27	5,56 ± 0,27
X Sibilância Persist. †	1,98 ± 0,27	5,32 ± 0,31	5,65 ± 0,30
SENSIBIL. TARDIA			
X Sibilância Tardia	2,16 ± 0,46	4,05 ± 0,47	5,58 ± 0,51
X Sibilância Persistente	2,24 ± 0,54	3,89 ± 0,54	4,64 ± 0,56

† - Interações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) de grupo e da interação grupo por tempo, em relação às crianças não sibilantes.

* - Diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p < 0,05$), quando comparados aos não sibilantes.

** - Comparações estatísticas feitas usando o Modelo saturado 3 de REM (ver métodos estatísticos da Pesquisa 2 para maiores detalhes)

Tabela 10. Média e desvio padrão da média do log. de IgE, de sibilância e sensibilização à testes cutâneos alérgicos (como efeitos principais) em relação à interação de sibilância e sensibilização em meninas**

	ENQUETE ANO 1	ENQUETE ANO 6	ENQUETE ANO 11
-EFEITO PRINCIPAL-			
SIBILÂNCIA: Nunca	1,23 ± 0,11	2,78 ± 0,15	3,04 ± 0,14
Precoce	0,95 ± 0,26	2,48 ± 0,28	2,76 ± 0,27
Tardia	1,58 ± 0,26	3,11 ± 0,27	3,39 ± 0,27
Persistente	1,10 ± 0,41	2,63 ± 0,43	2,91 ± 0,43
SENSIBILIZAÇÃO:			
Precoce †	1,36 ± 0,17	4,05 ± 0,21	5,18 ± 0,19
Tardia †	1,27 ± 0,25	3,27 ± 0,29	4,31 ± 0,28
-INTERAÇÕES-			
SENSIBIL. PRECOCE			
X Sibilância Tardia	1,33 ± 0,26	3,99 ± 0,29	5,15 ± 0,28
X Sibilância Persistente *	1,91 ± 0,35	4,58 ± 0,36	5,74 ± 0,36
SENSIBIL. TARDIA			
X Sibilância Tardia	1,07 ± 0,41	3,07 ± 0,43	4,09 ± 0,43
X Sibilância Persistente	2,00 ± 0,73	4,01 ± 0,75	5,02 ± 0,73

† - Interações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) de grupo e da interação grupo por tempo, em relação às crianças não sibilantes.

* - Diferenças estatisticamente quase significativas entre grupos ($p = 0,06$), quando comparados aos não sibilantes.

** - Comparações estatísticas feitas usando o Modelo saturado 3 de REM (ver métodos estatísticos da Pesquisa 2 para maiores detalhes)

Figura 5. IgE médio e intervalo de confiança para o Modelo 3, usando a análise de medições repetidas (“Random effects model”, REM) para meninos e meninas. As curvas representam os efeitos principais e as interações resultantes das análises longitudinais que incluíram categorias de sensibilização de testes cutâneos e sibilância (Tabelas 9 e 10). Sibilância tardia era significativa no modelo dos meninos, mas não é mostrada por uma razão de clareza (sua curva se sobrepõe à de sibilantes persistentes)

4.6. Discussão

Asma e sibilância recorrente durante a infância estão fortemente associadas a níveis séricos de IgE sérico elevados e à sensibilização alérgica a alergenios locais (67,74,75). Os níveis de IgE sérico total aumentam marcadamente durante a infância (83), e estudos recentes indicam que os níveis de IgE sérico já estão altos desde os 9 meses de idade nos indivíduos que vão ser sibilantes persistentes (10). Porém, não existem estudos que avaliam a relação entre o aumento de IgE sérico total durante a infância com os diferentes padrões de sibilância (fenótipos) e sensibilização alérgica. Nesta análise longitudinal se estudou o momento da ocorrência de sensibilização por testes cutâneos alérgicos e a evolução dos sintomas de sibilância em relação ao aumento de IgE sérico durante a infância.

Um achado inicial importante foi o de que níveis de IgE sérico seguem padrões mais ou menos estáveis de aumento durante a infância. Indivíduos com os mais altos níveis de IgE aos 9 meses de idade também apresentavam os mais altos níveis aos 6 e 11 anos, comparados com o restante da população. Como demonstrado por outros autores, se confirmou que crianças geralmente não apresentam níveis de IgE específico contra alergenios locais antes da idade de 3 anos (mesmo que eles já tenham sido sensibilizados para alguns alimentos). Este achado sugere que exista um padrão de produção aumentada de IgE em resposta a alergenios ambientais, ativo desde muito cedo na vida, que persiste por vários anos em certos grupos de indivíduos. Um achado muito interessante é o fato de que crianças sibilantes persistentes (i.e. meninos e meninas que estavam sibilando aos 9 meses e continuaram sibilando aos 6

e 11 anos) e que são sensibilizadas precocemente na vida (definidas neste estudo como crianças com teste cutâneo alérgico positivo a pelo menos um alérgeno aos 6 anos de idade) mostravam os níveis mais altos de IgE sérico durante a infância. Este achado oferece substrato para o conceito de que fatores genéticos atuando desde os primeiros instantes da vida, controlam os níveis de IgE sérico (57). Uma combinação de fatores ambientais e genéticos está provavelmente associada à sibilância persistente, e a influência da sensibilização alérgica precoce já estaria presente desde os 9 meses de idade, ou mesmo ainda, desde o período intra-uterino.

A importância do período em que ocorre a sensibilização cutânea a alérgenos ambientais comuns também é um achado importante deste estudo. Crianças que virão a ser sensibilizadas a aero-alérgenos comuns do meio ambiente aos 6 anos de idade apresentavam níveis elevados de IgE desde os 9 meses de idade, independentemente de uma história de sibilância no futuro para os meninos, mas não para as meninas. Este estudo indica que uma predisposição para resposta aos estímulos ambientais com níveis elevados de IgE precede a sensibilização alérgica, e portanto, a elevada produção de IgE e a sensibilização alérgica poderiam ser consequentes de um defeito comum no desenvolvimento do sistema imunológico. Peat e cols. (51), estudando 380 crianças em idade escolar, acharam que crianças com testes cutâneos alérgicos positivos (com idade abaixo de 8 a 10 anos) apresentavam maior risco de ter hiperreatividade bronquial, diagnóstico de asma e persistência de sibilância aos 12 anos de idade, quando comparados a crianças sensibilizadas mais tardiamente. Portanto, tanto sensibilização alérgica precoce (51) como produção elevada de IgE nos primeiros

períodos de vida (23) são fatores de risco importantes para o desenvolvimento de asma. Estes dados indicam que o padrão de desenvolvimento do sistema imunológico nos primeiros anos de vida é um determinante importante para a predisposição de asma na infância.

É importante reiterar que meninos sensibilizados precocemente e que eram sibilantes persistentes ou tardios apresentavam os mais altos níveis de IgE aos 6 e 11 anos (Figura 5), mas não se observou esta diferença nos níveis de IgE com os outros fenótipos aos 9 meses de idade (com exceção de não sibilantes e sibilantes transitórios precoces). Isto não foi observado em meninas, uma vez que somente meninas sibilantes persistentes e sensibilizadas precocemente apresentavam níveis elevados de IgE já desde os 9 meses de idade. Os achados deste estudo não explicam porque os níveis de IgE sérico se comportam diferentemente em meninos e meninas, mas eles oferecem alguma explicação de porque meninos têm uma maior predisposição que meninas em desenvolver IgE elevado desde cedo na vida. Isto poderia, em parte justificar a maior prevalência de asma em meninos comparados a meninas, na primeira década de vida (84,85).

Um achado interessante é que não se encontrou elevação significativa nos níveis de IgE entre as crianças que sibilavam aos 3 anos de idade e não após esta idade (sibilantes transitórios precoces, de acordo com a definição deste estudo), fossem elas meninas ou meninos. Este achado indica que sibilância a esta idade de 3 anos, para a grande maioria de crianças é uma condição não alérgica, como

previamente sugerido em outro estudo de sibilância associada a infecções respiratórias nos 3 primeiros anos de vida nesta mesma população em Tucson (23). Uma outra possibilidade é de que nós não tenhamos tido um número suficiente de indivíduos nesse sub-grupo, e portanto, não conseguimos poder estatístico suficiente para demonstrar alguma associação. Isto pode ter acontecido por erro de classificação. Se houvesse respostas aos questionários correspondendo à avaliação de 9 meses de IgE, mais crianças poderiam ter sido classificadas na categoria de sibilantes transitórios precoces, uma vez que a prevalência de sibilância é maior em idades mais iniciais. Para testar esta possibilidade nós analisamos sibilância precoce definida como sibilância associada a IVAls no primeiro ano de vida, em relação à IgE. Esta variável também não estava associada com valores mais altos de IgE, quando comparados à uma população não sibilante.

Sibilância no início da vida é em geral associada a IVAls, e a origem dessa associação entre infecções virais no início da vida e subsequente sensibilização não estão bem elucidadas (86,87,88). A idéia de que infecções virais nos primeiros anos de vida influenciam as respostas do sistema imunológico (em pessoas suscetíveis) não é nova. Welliver e cols. (89) demonstraram que crianças que tiveram bronquiolite nos primeiros 6 meses de vida e persistiram sibilando até os 4 anos de idade tinham níveis mais elevados de IgE específica ao vírus sincicial respiratório no momento da infecção. Estes dados sugerem existir um grupo de crianças com IVAls que está mais sujeita a desenvolver IgE específica a vírus e ter sibilância persistentemente. Os dados desse estudo indicam portanto, que sibilância precoce e persistente é associada a níveis

elevados de IgE, especialmente quando interagindo com sensibilização precoce. Se esta é a causa ou consequência de sibilância precoce e/ou persistente ou se as infecções associadas com sibilância causam maior sensibilização e IgE mais elevado são fatos que ainda precisam ser melhor estudados.

Um dos pressupostos das análises de REM é de que informações perdidas são “perdidas completamente ao acaso”. Para testar este pressuposto foi usado neste estudo uma técnica recentemente publicada por Park e cols. (90) que define variáveis indicadoras para cada padrão de dados perdidos e ajusta um modelo maior que inclui estas variáveis indicadoras e as co-variáveis de interesse. Uma vez que nenhuma de nossas variáveis indicadoras era significativamente diferente de zero, nós presumimos que nossos dados perdidos, estão realmente perdidos ao acaso.

Mesmo que os níveis de IgE observados entre as crianças sensibilizadas precocemente e com sibilância persistente fossem estatisticamente significativos aos 9 meses de idade, a grande variabilidade vista clinicamente entre pacientes individuais faz com que altos níveis de IgE, por si só, não seja uma boa medida para selecionar-se indivíduos com risco para desenvolver sintomas de sibilância ou sensibilização precoce.

Em resumo, este estudo demonstra que tanto o tempo de sensibilização cutânea a alérgenos comuns e os fenótipos de sibilância prevêm adequadamente níveis elevados de IgE em crianças, quando analisados longitudinalmente. Também se

observou que crianças ao mesmo tempo predispostas a sibilarem persistentemente e serem sensibilizadas precocemente, apresentaram níveis elevados de IgE desde os 9 meses de idade, e que estes níveis se mantiveram elevados com o passar da idade.

5. CONCLUSÃO:

O estudo longitudinal pediátrico de doenças respiratórias de Tucson no Arizona vem oferecendo à comunidade científica nos últimos anos uma séria de observações que permitem uma visão altamente inovadora quanto à história natural e fatores de risco associados à asma e à sibilância durante a infância. A idéia de que a maioria das crianças que sibilam nos primeiros três anos de vida não continuam sibilando após esta idade foi explorada por Martinez e cols (23) em artigo publicado no New England Journal of Medicine em 1995. Estes autores demonstraram que estes “sibilantes transitórios precoces” diferiam em vários aspectos de crianças que sibilavam persistentemente até os 6 anos de idade. Os sibilantes transitórios apresentavam função pulmonar diminuída mesmo antes de qualquer agressão respiratória viral, desde os primeiros meses de vida, que se mantinha baixa ainda aos 6 anos de idade (porém no mesmo percentil), não apresentavam maior risco de história materna de asma, e não apresentavam níveis de IgE aumentado ou maior risco de testes cutâneos alérgicos positivos. Crianças que iniciaram com sibilância abaixo dos 3 anos de idade e persistiam sibilando aos 6 anos tinham um maior risco de história familiar de asma, função pulmonar normal com 1 ano de idade que se deteriorava significativamente aos 6 anos de idade, e níveis elevados de IgE no início da vida persistindo até os 6 anos de idade.

Os dois estudos aqui apresentados em formato de tese dão continuidade ao estudo descrito acima e a outros estudos de acompanhamento da coorte de Tucson, Arizona. Na primeira pesquisa (Anexo 1), com as crianças agora acompanhadas até os

11 anos de idade, utilizamos três marcadores principais para ajudar a expandir a classificação dos fenótipos de sibilância na infância, reexaminando os fatores de risco e a evolução natural de sibilância nestes sub-grupos. Neste estudo, as crianças foram avaliadas através de teste de responsividade à metacolina, variabilidade de pico de fluxo expiratório aos 11 anos de idade e marcadores de atopia (testes cutâneos alérgicos aos 6 e 11 anos e IgE sérico ao nascimento, aos 9 meses, aos 6 e aos 11 anos de idade). Variabilidade de pico de fluxo expiratório positiva e hiper-responsividade à metacolina medidas aos 11 anos não se mostraram associadas com sibilância que ocorria somente nos primeiros 3 anos de vida, confirmando o que se observou no estudo publicado no *New England Journal of Medicine* em 1995. Variabilidade de pico de fluxo expiratório positiva e hiper-reatividade à metacolina estavam associados a crianças sibilando persistentemente aos 6 e aos 11 anos de idade. Variabilidade de pico de fluxo expiratório positiva estava associada à sibilância até os 6 anos de idade, mas não aos 11 anos, em crianças não atópicas. Hiper-responsividade à metacolina era mais frequentemente observada nos meninos e estava associada a níveis séricos elevados de IgE aos 6 e 11 anos e a testes cutâneos alérgicos positivos em sibilantes persistentes. Variabilidade de pico de fluxo expiratório não estava associada a sexo ou marcadores de atopia.

Estes resultados indicam existir outros sub-grupos de sibilantes durante a infância, além dos fenótipos de “sibilantes transitórios precoces”, que apresentam como característica principal vias aéreas de diâmetro reduzido, e dos “sibilantes persistentes” que têm as características e fatores de risco comuns aos asmáticos clássicos (ou seja,

história familiar de asma, hiper-responsividade á metacolina, testes cutâneos alérgicos positivos e níveis mais elevados de IgE). Esta pesquisa, agora acompanhando esta coorte de crianças até os 11 anos de idade confirmou os achados anteriores quanto aos 2 fenótipos mencionados acima, bem como identificou um terceiro sub-grupo de crianças não atópicas que apresenta sibilância até os 6 anos de idade e não após, e tem maior risco de ter variabilidade de pico de fluxo expiratório, mas não de ter hiper-reatividade á metacolina. Pode-se especular que este grupo de crianças apresenta uma síndrome menos severa de sibilância, mediada por fatores ambientais (por exemplo infecções virais e fumaça de cigarro), com conseqüente labilidade das vias aéreas, diferente do processo inflamatório crônico observado nas vias aéreas de asmáticos crônicos. A Figura 2 (Anexo 1) dá uma idéia gráfica da evolução natural desses sub-grupos de sibilantes da infância.

Para responder à questão específica da relação entre níveis séricos de IgE, momento da positivação de testes cutâneos alérgicos e sua relação com os diferentes fenótipos de sibilância da infância, utilizamos na Pesquisa 2 um sofisticado método estatístico (REM) que permitiu a avaliação realmente longitudinal dos níveis de IgE sérico medidos desde os 9 meses até os 11 anos de idade em um sub-grupo de crianças estudadas na pesquisa 1 (Anexo 2). Embora a classificação dos grupos de acordo com sua história de sibilância não tenha sido igual nos 2 estudos (ver métodos dos 2 estudos), os princípios básicos com os critérios para esta classificação são muito semelhantes. Como observado em estudos anteriores (23), crianças que sibilam até os 3 anos de idade e não após, apresentaram níveis médios de IgE sérico que não eram

significativamente diferentes das crianças que nunca sibilaram, independentemente do momento em que foram sensibilizados a alérgenos comuns. Se observou que IgE apresenta níveis elevados desde os 9 meses de idade os quais persistem elevados aos 6 e 11 anos em um sub-grupo de crianças suscetíveis. Crianças que vão desenvolver sibilância persistente e são sensibilizados antes dos 6 anos de idade apresentam os níveis mais elevados de IgE sérico, indicando que uma combinação de fatores genéticos e ambientais já estariam interagindo desde muito cedo na vida, quem sabe desde o período intra-uterino. Meninos, independentemente de sua história de sibilância, têm níveis de IgE significativamente mais altos que o grupo controle (não sibilantes e sibilantes transitórios precoces) aos 9 meses de idade. Se estes são sensibilizados precocemente ou ainda vão desenvolver sibilância persistente apresentarão os mais altos níveis de IgE aos 6 e 11 anos de idade. Somente as meninas que são sensibilizadas antes dos 6 anos e são sibilantes persistentes apresentam um padrão elevado de IgE desde os 9 meses de idade, que persiste até os 11 anos.

Estes estudos, portanto sugerem que desde muito cedo na vida, crianças que são predispostas a persistir sibilando já estão produzindo IgE em níveis mais elevados que crianças com síndromes sibilantes de melhor prognóstico ou que crianças normais. O fato de estas crianças apresentarem testes cutâneos positivos muito cedo na vida sugere também que seu sistema imunológico, seja por características genéticas ou por interação com o meio ambiente nos primeiros momentos da vida, é direcionado preferencialmente para uma rota alérgica desde os primeiros momentos.

Desta maneira, o estudo dos diferentes fenótipos de sibilância na infância e seus fatores de risco associados, nos oferecem uma visão renovada a esta síndrome que afeta um número imenso de pessoas, em escala global. No futuro, o estudo desses fenótipos em diferentes regiões, pelas diferentes interações genético-ambientais possíveis, poderia oferecer um melhor entendimento para planos de intervenção visando diminuir a morbidade dessa patologia de características tão complexas.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Gergen PJ, Weiss KB. The increasing problem of asthma in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1992; 144:823-824 (editorial)
2. CDC, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Asthma-United States, 1980-1990. *MMWR* 1992; 41(39):733-735
3. Barnes BJ. A new approach to the treatment of asthma. *N Engl J Med* 1989; 321:1517-1527
4. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320:271-277
5. Taussig LM, Wright AL, Harrison HR, Morgan WJ, and the GHMA Pediatricians. The Tucson Children's Respiratory Study (1): Design and implementation of a study of acute and chronic respiratory illness in children. *Am J Epidemiol* 1989; 129(6):1219-1231
6. Henderson FW, Stewart PW, Burchinal MR, et al. Respiratory allergy and the relationship between early childhood lower respiratory illness and subsequent lung function. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:283-290
7. Peat JK, Salome CM, Woolcock AJ. Longitudinal changes in atopy during a 4-year period: Relation to bronchial hyperresponsiveness and respiratory symptoms in a population sample of Australian schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:65-74

8. O'Keefe PT, Young S, Arnott, Henderson AJW, Stewart GA, Landau LI, LeSouef P. Association between DER P I exposure and airway responsiveness in early infancy. *Eur Respir J* 1994; 7(18):29
9. Gibson NA, Palmer L, Young S, Diepeveen, Rye P, Burton P, Landau LI, LeSouef P. Association between airway responsiveness (AR) at 1 month of age, and AR and development of asthma/atopy at 6 years of age. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:A468
10. Sporik R, Holgate ST, Cogswell JJ. Natural history of asthma in childhood- a birth cohort study. *Arch Dis Child* 1991; 66:1050-1053
11. Holt PG, Clogh JB, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Rose AH, Robinson BW, Thomas WR. Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy* 1992; 22(12): 1093-1099
12. Tang ML, Kemp AS, Thornburn J, Hill DJ. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994; 344:983-985
13. Martinez FD. Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood: Could they be protective? *Thorax* 1994; 49(12):1189-1191
14. Samet JM, tager IB, Speizer FE. The relationship between respiratory illness in childhood and chronic air-flow obstruction in adulthood. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:508-523
15. Martinez FD. Passive smoking and respiratory disorders other than cancer. IN: *Respiratory Health Environmental Assessment. Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency. Washington DC 1992*

16. Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, taussig LM, and the GHMA Pediatricians. Breast-feeding, lung function and lower respiratory tract illnesses (LRIs) during the first year of life. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137(4, part 2):405
17. Wright AL, Holberg CJ Taussig LM, Martinez FD. Relationship of infant feeding to recurrent wheezing at age six. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995; 149(7):758-763
18. Burr ML, Limb ES, Maguire MJ, Amarah L, Eldridge B, LAyzell JCM, Merret TG. Infant feeding, wheezing, and allergy: a prospective study. *Arch Dis Child* 1993; 68:724-728
19. Tepper RS, Rosemberg D, Eigen H. Airway responsiveness in infants following bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 1992; 13:6-10
20. Montgomery GL, Tepper RS. Changes in airway reactivity with age in normal infants and young children. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(6):1372-1376
21. Redline S, Tager IB, Segal MR, Gold D, Speizer FE, Weiss ST. The relationship between longitudinal changes in pulmonary function and nonspecific airway responsiveness in children and young adults. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:179-184
22. Yunginger JW, Reed CE, O'Connell EJ, Melton J, 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
23. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan W. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Eng J Med*, 1995;332:133-138
24. Sherman CB, Tosteson TD, Tager IB, Speizer FE, Weiss ST. Early childhood predictors of asthma. *Am J Epidemiol* 1990; 132:83-95

25. Voter KZ, Henry MM, Stewart PW, Henderson FW. Lower respiratory illness in early childhood and lung function and bronchial reactivity in adolescent males. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:302-307
26. Welliver RC, Kaul TN, Ogra PL. The appearance of cell-bound IgE in respiratory tract epithelium after respiratory-syncytial-virus infection. *N Engl J Med* 1980; 303:1198-1202
27. Welliver RC, Duffy L. The relationship of RSV-specific immunoglobulin E antibody responses in infancy, recurrent wheezing, and pulmonary function at age 7-8 years. *Pediatr pulmonol* 1993; 15:19-27
28. Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM. Initial airway function is a risk factor for recurrent wheezing respiratory illnesses during the first three years of life. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:312-316
29. Tager IB, Hanrahan JP, Tosteson TD, et al. Lung function, pre- and post-natal smoke exposure, and wheezing in the first year of life. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:811-817
30. Wright AL, Taussig LM, Ray CG, Harrison HR, Holberg CJ. The Tucson Children's respiratory study, II: lower respiratory tract illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 1232-46
31. Duff AL, Pomeranz ES, Gelber LE, Price GW, Farris H, Hayden FG, Platts-Mills TA, Heymann PW. Risk factors for acute wheezing in infants and children: viruses, passive smoke, and IgE antibodies to inhalant allergens. *Pediatrics* 1993; 92(4):535-540

32. Tepper RS, Morgan WJ, Cota W, Wright AL, Taussig LM. Physiologic growth and development of the lung during the first year of life. *Am Rev Resp Dis* 1986;134:513-19
33. Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1991;133: 1135-51
34. Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Morgan WJ, Taussig LM. Child day care, smoking by caregivers, and lower respiratory tract illness in the first three years of life. *Pediatrics* 1993; 91: 885-92
35. Morgan WJ, Martinez FD. Forced expiratory flow and lung volume track from infancy to early school years. *J Appl Physiol* 1998 (em vias de publicação)
36. Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Halonen M. Differential Immune responses to acute lower respiratory illness in early life by subsequent development of persistent wheezing and asthma. *Lancet* 1998 (em vias de publicação)
37. Phelan PD, Olinsky A, Osvald H. Asthma: classification, clinical patterns and natural history. *Baillieres Clin Paediatr* 1995; 3:307-318
38. Godden DJ, Ross S, Abdalla M et al. Outcome of wheze in childhood: symptoms and pulmonary function 25 years later. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:106-112
39. Wilson NM, Bridge P, Silverman M. Bronchial responsiveness and symptoms in 5-6 year old children: a comparison of direct and indirect challenge. *Thorax* 1995; 50:339-345

40. Lombardi E, Morgan WJ, Wright AL, Stein RT, Holberg CJ, Martinez FD. Cold air challenge at age 6 and subsequent incidence of asthma. *Am J Respir Crit*
41. Anderson LJ, Tsou C, Potter C, Keyserling HL, Smith TF, Anababa G, Bangha, CR. Cytokine response to respiratory syncytial virus stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infec Dis* 1994; 170: 1201-8
42. Kudlacz EM, Knippenberg RW. Parainfluenza virus type-3 infection attenuates the respiratory effects of antigen challenge in sensitized guinea pigs. *Inflamm Res* 1995; 44: 105-110
43. Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Halonen M. Association of non-wheezing lower respiratory tract illnesses in early life with persistently diminished serum IgE levels. *Thorax* 1995; 50: 1067-72 *Care Med* 1997; 156:1863-1869
44. Wardlaw AJ. Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. *Postgrad Med J* 1994; 70:536-552
45. Garofalo R, Dorris A, Ahlstedt S, Welliver RC. Peripheral blood eosinophil count and eosinophilic cationic protein content of respiratory secretions in bronchiolitis: relationship to severity of disease. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5:111-117
46. Bass DA. Behaviour of eosinophil leukocytes in acute inflammation. II. Eosinophil dynamics during acute inflammation. *J Clin Invest* 1975; 56:870-879
47. Sigurs N, Bjarnason R, Sigur-Bergsson F. Eosinophil cationic protein in nasal secretion and in serum and myeloperoxidase in serum in respiratory syncytial virus bronchiolitis: relation to asthma and atopy. *Acta Paediatr* 1994

48. Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Halonen M. Association of interleukin-2 and interferon- γ 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
49. Halonen M, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Martinez FD. *Alternaria* as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1356-1361
50. Peat JK, Toelle BG, Gray EJ, Haby MM, Belousova E, Woolcock AJ. Prevalence and severity of childhood asthma and allergic sensitization in seven climatic regions of New South Wales. *Med J Aust* 1995; 163:22-26
51. Peat JK, Salome CM, Woolcock AL. Longitudinal changes in atopy during a 4-year period: relation to bronchial hyperresponsiveness and respiratory symptoms in a population sample of Australian schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:65-74
52. Sears MR, Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Silva PA. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:419-424
53. 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
54. Holberg CJ, Elston RC, Halonen M, Wright AL, Taussig LM, Morgan WJ, Martinez FD. Segregation analysis of physician-diagnosed asthma in hispanic and non-hispanic white families: A recessive component? *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 144-150

55. 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 Eng J Med* 1991; 325:1067-1071
56. Blumenthal MN, Namboodiri KK, Mendel NR, Gleich GJ, Elston RC, Yunis EJ. Genetic transmission of serum IgE levels. *Am J Med Genet* 1981; 10:219-228
57. Martinez FD, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Wright AL, Taussig LM. Evidence for mendelian inheritance of serum IgE levels in Hispanic and non-Hispanic White families. *Am J Hum Genet* 1994; 5:555-565
58. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kantsky E, Schon C, Krishnaswamy G, Beaty TM. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q 31.1 markers and total serum IgE concentrations. *Science* 1994; 264: 1152-1156)
59. Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC, Bleecker ER. Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5q. *Genomics* 1994; 23:464-470
60. Siersted HC, Hansen HS, Hansen N-C, Hyldebrandt N, Moostgard G, Oxhoj H. Evaluation of peak expiratory flow variability in an adolescent population sample. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:598-603
61. Higgins BG, Britton JR, Chinn S, Cooper S, Burney PGJ, Tattersfield AE. Comparison of bronchial reactivity and peak flow variability measurements for epidemiologic studies. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:588-93

62. Higgins BJ, Britton JR, Chinn S, Jones TD, Jenkinson D, Burney PGJ, et al. The distribution of peak expiratory flow variability in a population sample. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1368-1372
63. Quackenboss JJ, Lebowitz MD, Kryzanowski M. The normal range of diurnal changes in peak expiratory flow rates. *AM Rev respir Dis* 1991; 143:323-330
64. Quanjar PH, Lebowitz MD, Gregg I, Miller MR, Pedersen OF. Peak expiratory flow: conclusions and recommendations of a working part of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1997; 10(Suppl 24):2s-8s
65. Yan K, Salome, Woolcock AJ. Rapid method for measurement of bronchial responsiveness. *Thorax* 1983; 38:760-765
66. Pattemore PK, Asher MI, Harrison AC, Mitchel EA, Rea HH, Stewart AW. The interrelationship among bronchial hyperresponsiveness, the diagnosis of asthma, and asthma symptom. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:549-554
67. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and apparently normal children. *N Engl J Med* 1991; 325:1067-1071
68. Halonen M, Stern DA, Lyle S, Wright AL, Martinez FD. Relationships of total serum IgE levels in cord and 9-month sera of infants. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:235-241
69. Adachi Y, Murakami G, Matsuno M, Adashi Y, Kayahara M, Okada T, Yoshizumy A. Longitudinal study of bronchial hyperactivity in preschool children with bronchial asthma. *Ann Allergy* 1992; 68:261-266

70. Brand PLP, Postma DS, Kerstjens HAM, Koetner GH, and the Dutch CNSLD study group. Relationships of airway hyperresponsiveness to respiratory symptoms and diurnal peak flow variation in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:916-921
71. Siersted HC, Mostgaard G, Hyldebrandt N, Hansen HS, Boldsen J, Oxhøj H. Interrelations between diagnosed asthma, asthma-like symptoms, and abnormal airway behaviour in adolescence: the Odense Schoolchild Study. *Thorax* 1996; 51:503-509
72. Hanrahan JP, Brown RW, Carey VJ, Castile RG, Speizer FE, Tager IB. Passive respiratory mechanics in healthy infants: effects on growth, gender and smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:670-680
73. Stick SM, Arnott J, Turner DJ, Young S, Landau LI, LeSouef P. Bronchial responsiveness and lung function in recurrently wheezy infants. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1012-1015
74. Burrows B, Martinez FD, Cline MG, Lebowitz MD. *Am Rev Respir Crit Care Med* 1995; 152(5):1497-1500
75. Freidhoff LR, Marsh DG. Relationship among asthma, serum IgE and skin test sensitivity to inhaled allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 100:355-361
76. Freidhoff LR, Meyers D, Marsh D. A genetic epidemiologic study of human immune responsiveness to allergens in an industrial population. II. The associations among skin sensitivity, total serum IgE, age and sex in a stratified random sample. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:490-499

77. Sunyer J, Anto JM, Castellsague J, Soriano JB, Roca J. Total serum IgE is associated with asthma independently of specific IgE levels. *Eur Respi J* 1996
78. Backer V, Ulrik CS, Wendelboe D, Bach-Mortensen N, Hansen KK, Larsen EM, Dirksen A. Distribution of serum IgE in children and adolescents aged 7 to 16 years in Copenhagen, in relation to factors of importance. *Allergy* 1992; 47:484-489
79. Barbee R, Halonen M, Lebowitz MD, Burrows B. Distribution of IgE in a community population sample: correlation with age, sex and allergen skin test reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68:106-111
80. Burrows B, Halonen M, Barbee RA. The relationship of serum immunoglobulin E to cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 523-525
81. Jones RH. Longitudinal data with serial correlation: A statespace approach. 1993. Chapman and Hall, London
82. Jones RH, Boadi-Boateng F. Unequally spaced longitudinal data with AR(I) serial correlation. *Biometrics* 1991; 47:161-175
83. Barbee RA, Kaltenborn W, Lebowitz MD, Burrows B. Longitudinal changes in allergen skin test reactivity in a community population sample. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79:16-24
84. Horwood CJ, Fergusson DM, Shanon FT. Social and familial factors in the development of early childhood asthma. *Pediatrics* 1985; 75:859-868
85. Holberg CJ, Elston RC, Halonen M, Wright AL, Taussig LM, Morgan WJ, Martinez FD. Segregation analysis of physician-diagnosed asthma in hispanic and non-hispanic white families. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:144-150

86. Sears MRG, Herbison P, Holdaway CJ, Hewitt EM, Flannery, Silva PA. The relative risk of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:418-435
87. Cogswell, Halliday DF, Alexander JR. Respiratory infection in the first years of life in children at risk for developing atopy. *BMJ* 1982; 284:1011-1013
88. Simms DG, Gardner PS, Wightman D, Turner MW, Soothill JH. Atopy does not predispose to RSV bronchiolitis or post-bronchiolitic wheezing. *BMJ* 1981; 282:2086-2088
89. Welliver RC, Sun M, Rinaldo D, Ogra PL. Predictive values of respiratory syncytial virus specific IgE responses for recurrent wheezing following bronchiolitis. *J Pediatr* 1986; 109: 776-780
90. Park T, Lee. A test of missing completely at random for longitudinal data with missing observations. *Statist Med* 1997; 332:16:1859-1871

Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood

Renato T Stein, Catharine J Holberg, Wayne J Morgan, Anne L Wright, Enrico Lombardi, Lynn Taussig, Fernando D Martinez

Abstract

Background - There is increasing evidence that wheezing during childhood may be a heterogeneous condition, and that different forms of wheezing may be associated with different risk factors and prognosis. The aim of this study was to determine if measures of airway lability and of atopy could identify distinct wheezing phenotypes during childhood.

Methods - In a cohort of children followed from birth peak flow variability ($n=600$) was evaluated and methacholine challenge responsiveness ($n=397$) was measured at age 11 in relation to wheezing before the age of three, and at age six and 11 years total serum IgE and skin test reactivity to allergens were determined.

Results - Neither positive peak flow variability nor methacholine hyperresponsiveness measured at age 11 were associated with wheezing occurring only during the first three years of life. Both methacholine hyperresponsiveness and positive peak flow variability were associated with wheezing at both ages six and 11 (OR 5.1 (95% CI 2.4 to 10.6) and 2.3 (1.2 to 4.5), respectively). In addition, positive peak flow variability was associated with wheezing up to the age of six but not at age 11 in non-atopic children (OR 2.9 (95% CI 1.0 to 8.8)). Methacholine hyperresponsiveness measured at age 11 was more frequently observed in boys (OR 2.1 (95% CI 1.2 to 3.5)) and was strongly associated with serum IgE levels measured at ages six and 11 ($p<0.001$) and with positive skin test reactivity (OR 4.5 (95% CI 2.0 to 10.1)). Peak flow variability was unrelated to sex or markers of atopy (IgE and skin test reactivity).

Conclusions - Methacholine responsiveness and peak flow variability assessed at age 11, together with markers of atopy (IgE and skin test reactivity to allergens) identify three different wheezing phenotypes in childhood: "transient early wheezing" limited to the first three years of life and unrelated to increased airway lability; "non-atopic wheezing" of the toddler and early school years associated with positive peak flow variability but not with methacholine hyperresponsiveness; and "IgE-associated

wheeze/asthma" associated with persistent wheezing at any age and with methacholine hyperresponsiveness, peak flow variability, and markers of atopy.

(Thorax 1997;52:946-952)

Keywords: methacholine, peak flow, atopy, wheezing, children.

There is increasing evidence to suggest that wheezing in childhood may represent a heterogeneous condition, with distinct phenotypic expressions associated with different clinical manifestations and risk factors.¹ We recently reported, for example, that at least two different wheezing syndromes coexist in infants and young children²: wheezing which is associated with lower levels of lung function at birth and with a high probability of remission before six years of age and wheezing associated with the classical risk factors for asthma and persistence of symptoms at the age of six. Although a strong correlation between bronchial hyperresponsiveness and frequency and severity of wheezing is known to exist among children aged 8-15 years,³⁻⁷ no such correlation was recently found among children aged 4-5 years⁸ which suggests that wheezing during the toddler years may be different phenotypically from wheezing in older children.

Both methacholine responsiveness and peak flow variability have been used to assess airway lability in children of different ages. Although the association between methacholine hyperresponsiveness and markers of atopy has been well established⁹⁻¹¹ there is little information on the alterations in the airway responsible for increased peak flow variability as assessed by the use of peak flow meters.¹²⁻¹⁴ Recent reports¹³⁻¹⁶ suggest that peak flow variability and measures of bronchial responsiveness to pharmacological agents probably yield information on different but related phenomena.

The aim of our study was to assess the relation of two indices of airway lability - peak flow variability and the methacholine dose-response slope - measured at the age of 11 years to wheeze at different ages (<3, 6, and 11 years) and to markers of atopy in a large population sample followed from birth.

Methods

Participants in the study were enrolled as newborn infants between May 1980 and October

Respiratory Sciences Center, The University of Arizona, Tucson, Arizona AZ 85724, USA

R T Stein
C J Holberg
W J Morgan
A L Wright,
E Lombardi
L Taussig
F D Martinez

Correspondence to:
Dr F D Martinez.

Received 19 July 1996
Returned to authors
7 October 1996
Revised version received
14 July 1997
Accepted for publication
16 July 1997

1984 as part of the Tucson Children's Respiratory Study (CRS).¹⁷ A total of 1246 children were initially enrolled. Details on data collection and procedures are presented elsewhere.^{17,18}

During the first three years of life parents were instructed to see their paediatricians whenever their children presented with signs or symptoms of lower respiratory tract illness. When children reached a mean (SD) age of 6.3 (0.9) years ("age 6", n=1024) and 10.9 (0.6) years ("age 11", n=956) the parents completed questionnaires regarding their children's respiratory symptoms. For both the age 6 and age 11 surveys wheeze was defined as parental reporting of any wheezing episode in the previous 12 months, regardless of a diagnosis of asthma. To assess the association of measurements of airway lability with persistent or remitting wheezing, subjects were classified according to their wheezing status at ages <3 and 6 years and then at ages 6 and 11 years.

The study was approved by the Human Subjects Committee at the University of Arizona. Parents signed separate consent forms for the initial enrolment of the infants and for other studies described in this paper.

PEAK EXPIRATORY FLOW AND METHACHOLINE CHALLENGE TESTS

A total of 754 children were still living in Tucson at the time of the age 11 survey. Of these, a total of 676 children took home peak flow meters to measure peak flow (PEF) three times daily for one week. Children and their parents were trained by study nurses on the use of the PEF meter. Subjects were asked to record on a diary the best of three attempts after waking up in the morning, when they came home from school in the afternoon, and before going to bed at night. To assess the "learning effect" on PEF measurements we tested Cochran's Q¹⁹ using all three sessions for the seven day period. Only measures from the first morning of the study were found to be lacking homogeneity with the rest of the week's values and were thus eliminated from the analysis. Only children who recorded PEF measurements at least twice per day (after elimination of measures from the first morning of the study) for at least 4 days were included in the analysis.¹⁶

The amplitude percent mean (Amp%mean) was chosen as the peak flow variability index^{15,19} and defined as:

$$\text{Amp\%mean} = \frac{\sum (\text{maximum daily PEF} - \text{minimum daily PEF})}{\text{number of days in the period}} \times 100$$

Positive peak flow variability was considered to be present in subjects with Amp%mean values above the 90th percentile for a healthy reference subgroup (subjects who were skin test negative, had never wheezed, nor had been diagnosed as having asthma, n=136). To validate the Amp%mean variable and cut off level better we also assessed an index of PEF variability that considers "labile" subjects with at

least one PEF value exceeding 30% of the daily mean.^{12,20} Results using this 30% amplitude index were not different from those obtained using the Amp%mean and for this reason only the latter results are presented here.

Because at the time the study was designed there were concerns regarding parental acceptability and safety of the methacholine challenge for symptomatic patients, children who had used asthma medications in the previous three months were excluded from methacholine testing. Children who had had an upper respiratory infection in the previous four weeks or a lower respiratory infection in the previous six weeks, those with cardiac problems, other systemic diseases, or with reactions such as severe headaches were also excluded. Challenges were performed using the protocol described by Yan *et al*²¹ with nebulised cumulative doses of methacholine ranging from 0.004 to 2.048 mg.

Results for methacholine challenge were expressed as the methacholine-DRS. The end point was defined as a 20% fall in forced expiratory volume in one second (FEV₁) from baseline or FEV₁ at the final cumulative dose of 2.048 mg. The response was calculated as the two point slope between baseline and end point FEV₁ per log dose⁹:

methacholine-DRS =

$$\frac{(\text{last FEV}_1 - \text{baseline FEV}_1)}{\log \text{ last dose}}$$

We defined bronchial hyperresponsiveness as methacholine-DRS values below the 10th percentile of the methacholine-DRS distribution for a healthy reference subgroup (as defined for the PEF group, n=100). The methacholine response was also determined by the PD₂₀, as described previously.²² Results using PD₂₀ were not different from those of the methacholine-DRS index and therefore will not be presented in this paper.

MEASURES OF MARKERS OF ATOPY

Skin prick tests were performed using extracts of common allergens in the Tucson area. At six years of age house dust, bermuda grass, olive, careless weed, alternaria, mesquite, and mulberry were used and at age 11 *Dermaphagoides farinae* and cat dander were added (allergens provided by Holister-Stier Laboratories, Everett, Washington, USA). Skin test positive subjects were defined as those who had at least one positive reaction (weal size measuring 3 mm or more after subtraction of the control value) in either of the two surveys in which they were performed.

Blood for serum IgE analysis was obtained at birth from the umbilical cord, at a median age of 9.3 months (the "9 month" sample), and again at ages 6 and 11. Total serum IgE levels were measured with paper radioimmunosorbent test (Pharmacia Diagnostics, Piscataway, New Jersey, USA).²³

Table 1 Characteristics at the age 11 survey of subjects who performed peak expiratory flow (PEF), of those who performed methacholine challenge, and of subjects with no tests (reference group)

	PEF (n = 600)	Methacholine (n = 397)	No tests (n = 303)
Age (years)	10.8**	10.7***	11.2
Sex (male)	48%	48.2%	48.0%
Maternal asthma	12.8%	8.6%	12.8%
Wheeze with LRIs (age ≤ 3)	39.8%	36.6%	37.2%
Wheeze (age 11)	27.8%	19.9%*	25%
Mean (SE) baseline FEV ₁ (l/s)	2.18 (3.4)	2.18 (3.3)	†
Skin test positive	63.0%	65.1%	†

*** p ≤ 0.001; ** p ≤ 0.01; * p ≤ 0.05.

Groups of children who did PEF and methacholine tests are not exclusive. Statistical differences were calculated between PEF and methacholine groups in relation to the no tests group. Data were missing for certain characteristics in some children.

† A very small number of subjects were tested in this group (27 with FEV₁, and 79 with skin tests), and thus comparisons may not be meaningful.

STATISTICAL ANALYSIS

Contingency tables and the χ^2 distribution were used for bivariate analysis and logistic regression for multivariate evaluation of dichotomous outcome data. The 95% confidence intervals (CI) for odds ratios were calculated with standard algorithms. The continuous distribution of IgE levels at each survey was categorised in quartiles and assessed for relation with Amp%mean and methacholine-DRS using a χ^2 for trend test. Statistical significance was defined by a two-sided alpha level of 0.05.

Results

STUDY POPULATION

Of the 655 children contacted for methacholine testing, 213 were excluded (78 because of the use of asthma medications in the previous three months, 93 because they refused or missed the appointment, and 42 because of infections of the upper or lower respiratory tracts in the previous weeks, headaches, congenital problems, or other associated diseases) and 45 had poor test performance, leaving 397 subjects with valid tests. Of the 676 children who were sent home with PEF meters, diaries were recovered from 664, of which 64 had inadequate or insufficient data. A total of 350 children had both valid PEF measures and methacholine challenge tests; 303 children had no data either

for peak flow variability or for methacholine-DRS. There were no significant differences in sex distribution, height, maternal level of education, maternal history of asthma or wheezing with lower respiratory tract infections in the first three years of life for children with valid methacholine challenge and peak flow variability tests compared with children who did not perform any of the tests (table 1). The prevalence of wheezing at 11 years of age was significantly lower in the methacholine group than in the group that underwent no tests, probably because of the exclusion of children requiring asthma medication in the previous three months from the methacholine group. Baseline FEV₁ at age 11 was similar for children who performed either PEF or methacholine challenge tests. The children in the group that performed no tests were slightly older. There were 711 children who had allergy skin tests in both surveys, 68% of whom had at least one positive skin test.

AMP%MEAN AND METHACHOLINE-DRS CUT OFF VALUES

Subjects were classified as having positive peak flow variability if Amp%mean values were greater than or equal to the cut off value of 16.6% (the 90th percentile for the healthy reference population sample). Among children who performed methacholine challenge, those who had a coefficient less than or equal to -0.403 ml/log dose unit represented the lower 10th percentile and were thus defined as having methacholine hyperresponsiveness.

ASSOCIATION OF METHACHOLINE HYPERRESPONSIVENESS AND POSITIVE PEAK FLOW VARIABILITY AT AGE 11 TO WHEEZING AT DIFFERENT AGES, ALLERGY SKIN TESTS, AND SEX
Bivariate analysis (table 2) showed that children who had positive peak flow variability at age 11 were almost twice as likely to have wheezed at age <3 compared with children who did not wheeze at that age (odds ratio (OR) 1.9 (95%

Table 2 Association† of methacholine hyperresponsiveness and peak flow variability at age 11 to wheezing at different times, allergy skin tests, and sex (univariate analysis)

	Methacholine positive			Peak flow variability positive		
	n	%	OR (95% CI)	n	%	OR (95% CI)
Wheeze ≤ 3 yr						
Yes	126	27.8	1.1 (0.6 to 1.7)	192	14.1	1.9 (1.1 to 3.3)*
No	218	26.6		322	8.1	
Wheeze age 6						
Yes	83	32.5	1.6 (0.9 to 2.6)	163	15.3	2.0 (1.1 to 3.4)**
No	312	23.4		427	8.3	
Wheeze age 11						
Yes	78	51.3	4.4 (2.6 to 7.4)***	166	13.9	1.6 (0.9 to 2.8)
No	314	19.4		431	9.0	
Skin test						
(+)	244	34.0	4.3 (2.4 to 7.8)***	372	9.7	0.9 (0.5 to 1.6)
(-)	141	10.6		199	10.6	
Sex						
Male	192	33.9	2.3 (1.4 to 3.7)***	286	11.2	1.2 (0.7 to 2.0)
Female	204	18.1		313	9.5	
URIs††						
Yes	—	—	—	57	17.5	2.1 (1.0 to 4.5)*
No	—	—	—	479	9.0	

*** p ≤ 0.001; ** p ≤ 0.01; * p ≤ 0.05.

† OR (odds ratio) and 95% CI (95% confidence interval).

†† URIs = upper respiratory infections at age 11; subjects with URIs were excluded from methacholine challenge.

Table 3 Association† of methacholine hyperresponsiveness and peak flow variability at age 11 to wheezing at different times, allergy skin tests, and sex (multivariate logistic regression analysis)

	Methacholine positive (OR 95% CI)†	Peak flow variability (OR 95% CI)†
Wheeze ≤ 3 yr	1.1 (0.6 to 1.9)	1.6 (0.9 to 2.9)
Wheeze age 6	0.9 (0.5 to 1.7)	2.1 (1.0 to 4.1)*
Wheeze age 11	3.2 (1.7 to 5.9)***	1.1 (0.5 to 2.4)
Positive skin test	3.0 (1.6 to 5.6)***	0.8 (0.4 to 1.5)
Sex (male)	2.1 (1.2 to 3.5)**	1.0 (0.6 to 2.0)
URIs††	-	0.9 (0.8 to 1.0)

*** p ≤ 0.001; ** p ≤ 0.01; * p ≤ 0.05.

† OR (odds ratio) and 95% CI (95% confidence interval).

†† URIs = upper respiratory infections at age 11; subjects with URIs were excluded from methacholine challenge.

CI 1.1 to 3.3), p < 0.05). There was also a significant association between positive peak flow variability and wheeze at age 6 (OR 2.0 (95% CI 1.1 to 3.4), p < 0.01) but not with wheeze at age 11. Fifty seven children among those who performed PEF tests at age 11 had upper respiratory tract infections in the previous four weeks (there were no children with lower respiratory tract infections among those who performed PEF tests). Children with upper respiratory tract infection at the time of the age 11 survey had a significantly higher prevalence of positive peak flow variability at that age (OR 2.1 (95% CI 1.0 to 4.5), p < 0.05) than those without upper respiratory tract infections. Neither sex nor positive skin tests to allergens were associated with peak flow variability. In contrast, positive methacholine was associated with wheeze at age 11 (OR 4.4 (95% CI 2.6 to 7.4), p < 0.001) but not with wheeze at ages 6 or < 3 years. There was also a fourfold increased risk of being methacholine positive for skin test positive subjects compared with those who were skin test negative (OR 4.3 (95% CI 2.4 to 7.8), p < 0.001). Boys were at a significantly higher risk of having methacholine hyperresponsiveness than girls (OR 2.3 (95% CI 1.4 to 3.7), p < 0.001).

Logistic regression analysis (table 3), with methacholine hyperresponsiveness and positive peak flow variability measured at age 11 as the

dependent variables, showed that only wheezing at age 6 was a significant and independent predictor associated with positive peak flow variability (OR 2.1 (95% CI 1.0 to 4.1), p < 0.05) after adjusting for wheezing at other times, skin test response, sex, and upper respiratory tract infections. At age 11 upper respiratory tract infections were not shown to be independently associated with positive peak flow variability (table 3). In contrast, methacholine hyperresponsiveness at age 11 was associated with wheezing at age 11 (OR 3.2 (95% CI 1.7 to 5.9), p < 0.001), positive skin test results (OR 3.0 (95% CI 1.6 to 5.6), p < 0.001), and with the male sex (OR 2.1 (95% CI 1.2 to 3.5), p < 0.05). Methacholine hyperresponsiveness at age 11 showed no association with wheeze at ages < 3 or 6 years.

ASSOCIATION OF METHACHOLINE HYPERRESPONSIVENESS AND POSITIVE PEAK FLOW VARIABILITY AT AGE 11 TO WHEEZING GROUPS AT AGES 3 AND 6

Children were assigned to four groups according to their wheezing status during the first six years of life (table 4), as described in our previous study.² Neither positive peak flow variability nor methacholine hyperresponsiveness at age 11 were associated with "transient early wheezing" - that is, wheezing during the first three years of life but no wheezing at six years of age. Positive peak flow variability at age 11 years was significantly associated with wheezing at age 6 (skin test negative subjects who wheezed at age 6 but not at age 3 (OR 3.3 (95% CI 1.0 to 12.5), p < 0.05), and skin test positive subjects who were wheezing at both surveys (OR 3.3 (95% CI 1.3 to 8.8), p < 0.01)). Methacholine hyperresponsiveness at age 11 was unrelated to any of the groups of wheezers up to age 6, although there was a marginal association for subjects who were wheezing both at ages 3 and 6 among those who were skin test positive.

Table 4 Association† of methacholine hyperresponsiveness (Mch positive) and peak flow variability (PEF var positive) measured at age 11 to wheezing at age 3 and age 6 surveys†††

	Total		Skin test negative		Skin test positive	
	Mch positive	PEFvar positive	Mch positive	PEFvar positive	Mch positive	PEFvar positive
No wheeze by 3/no wheeze at 6						
% positive	26	7	14	8	32	6
N+ / N group	49/188	19/262	10/71	8/105	36/113	9/145
OR (95% CI)‡	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Yes wheeze by 3/no wheeze at 6						
% positive	22	10	10	9	32	11
N+ / N group	18/80	10/100	3/30	3/34	15/47	7/61
OR (95% CI)	0.9 (0.5 to 1.6)	1.4 (0.6 to 3.2)	0.7 (0.2 to 2.7)	1.1 (0.3 to 4.6)	1.0 (0.5 to 2.2)	2.0 (0.7 to 5.8)
No wheeze by 3/yes wheeze at 6						
% positive	28	14	7	22	39	10
N+ / N group	13/47	12/85	1/15	5/23	12/31	6/59
OR (95% CI)	0.9 (0.4 to 1.9)	2.1 (1.0 to 4.6)*	0.4 (0.04 to 3.5)	3.3 (1.0 to 12.5)*	1.2 (0.5 to 2.9)	1.1 (0.6 to 5.0)
Yes wheeze by 3/yes wheeze at 6						
% positive	39	19	11	15	52	18
N+ / N group	13/33	13/70	1/9	2/13	12/23	10/54
OR (95% CI)	1.7 (0.8 to 3.7)	2.8 (1.3 to 6.2)**	0.7 (0.2 to 7.5)	2.5 (0.4 to 13.7)	2.0 (0.8 to 5.2)	3.3 (1.3 to 8.8)**

** p ≤ 0.01; * p ≤ 0.05.

† OR (odds ratio) and 95% CI (95% confidence interval) adjusted by sex and for URIs.

†† Groups are the same as described in previous study: No wheeze both by age 3 and age 6 (no wheeze by 3/no wheeze at 6); wheezing by age 3 and no wheezing at age 6 (yes wheeze by 3/no wheeze at 6); no wheezing by age 3, and wheezing at age 6 (no wheeze by 3/yes wheeze at 6); and wheezing both at age 3 and 6 (yes wheeze by 3/yes wheeze at 6).

††† Total number of subjects is greater than subtotals for skin test positive and skin test negative subjects because some subjects did not have skin test results.

‡ Reference odds ratio.

Table 5 Association† of methacholine hyperresponsiveness (Mch positive) and peak flow variability (PEFvar positive) measured at age 11 to wheezing at age 6 and age 11 surveys†††

	Total		Skin test negative		Skin test positive	
	Mch positive	PEFvar positive	Mch positive	PEFvar positive	Mch positive	PEFvar positive
No wheeze by 6/no wheeze at 11						
% positive	21	52	8	8	32	8
N+/N group	56/268	29/356	13/153	12/150	35/108	12/150
OR (95% CI)‡	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Yes wheeze at 6/no wheeze at 11						
% positive	11	13	4	19	18	8
N+/N group	5/46	9/70	1/23	6/31	4/22	3/37
OR (95% CI)	0.4 (0.1 to 1.1)	1.6 (0.7 to 3.7)	0.3 (0.04 to 2.5)	2.9 (1.0 to 8.8)*	0.6 (0.2 to 1.9)	1.0 (0.3 to 3.7)
No wheeze at 6/yes wheeze at 11						
% positive	42	10	1	10	48	9
N+/N group	17/40	7/68	1/8	1/10	15/31	5/56
OR (95% CI)	2.8 (1.4 to 5.6)**	1.3 (0.5 to 3.1)	1.0 (0.1 to 9.2)	1.3 (0.1 to 11.3)	2.5 (1.1 to 5.7)*	1.1 (0.4 to 3.1)
Yes wheeze at 6/yes wheeze at 11						
% positive	59	17	—	20	65	15
N+/N group	22/37	16/93	0/2	1/5	22/34	13/85
OR (95% CI)	5.1 (2.4 to 10.6)***	2.3 (1.2 to 4.5)**	—	2.9 (0.3 to 28.1)	4.5 (2.0 to 10.1)***	1.9 (0.9 to 4.4)

*** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

† OR (odds ratio) and 95% CI (95% confidence interval) adjusted by sex and for URIs.

†† No wheeze both at age 6 and 11 (no wheeze at 6/no wheeze at 11); wheezing by age 6 and no wheezing at age 11 (yes wheeze at 6/no wheeze at 11); no wheezing at age 6 and wheezing at age 11 (no wheeze at 6/yes wheeze at 11); and wheezing both at age 6 and 11 (yes wheeze at 6/yes wheeze at 11).

††† Total number of subjects is greater than subtotals for skin test positive and skin test negative subjects because some subjects did not have skin test results.

‡ Reference odds ratio.

ASSOCIATION OF METHACHOLINE HYPERRESPONSIVENESS AND POSITIVE PEAK FLOW VARIABILITY AT AGE 11 TO WHEEZING GROUPS AT AGES 6 AND 11

Children were also grouped according to their wheezing status at ages 6 and 11 (table 5). Children who had methacholine hyperresponsiveness at age 11 and were skin test positive were more likely to be wheezing at age 11 irrespective of wheezing at age 6 (OR 2.5 (95% CI 1.1 to 5.7), $p < 0.05$ and 4.5 (95% CI 2.0 to 10.1), $p < 0.001$ for no wheeze at 6/yes wheeze at 11 and yes wheeze at 6/yes wheeze at 11, respectively). In addition, positive peak flow variability at age 11 was significantly associated with persistent wheezing (OR 2.3 (95% CI 1.2 to 4.5), $p \leq 0.01$ for yes wheeze at 6/yes wheeze at 11). Conversely, children

who had positive peak flow variability at age 11 and were skin test negative were also at an increased risk of having wheezed at age 6 but not at 11 (OR 2.9 (95% CI 1.0 to 8.8), $p \leq 0.05$ for yes wheeze at 6/no wheeze at 11).

ASSOCIATION OF METHACHOLINE HYPERRESPONSIVENESS AND POSITIVE PEAK FLOW VARIABILITY AT AGE 11 TO TOTAL SERUM IGE MEASURED AT DIFFERENT SURVEYS

Positive peak flow variability at age 11 was not found to be related to high serum IgE levels in any of the surveys at which this variable was assessed (fig 1). In contrast, methacholine hyperresponsiveness at age 11 was marginally correlated with log total serum IgE levels

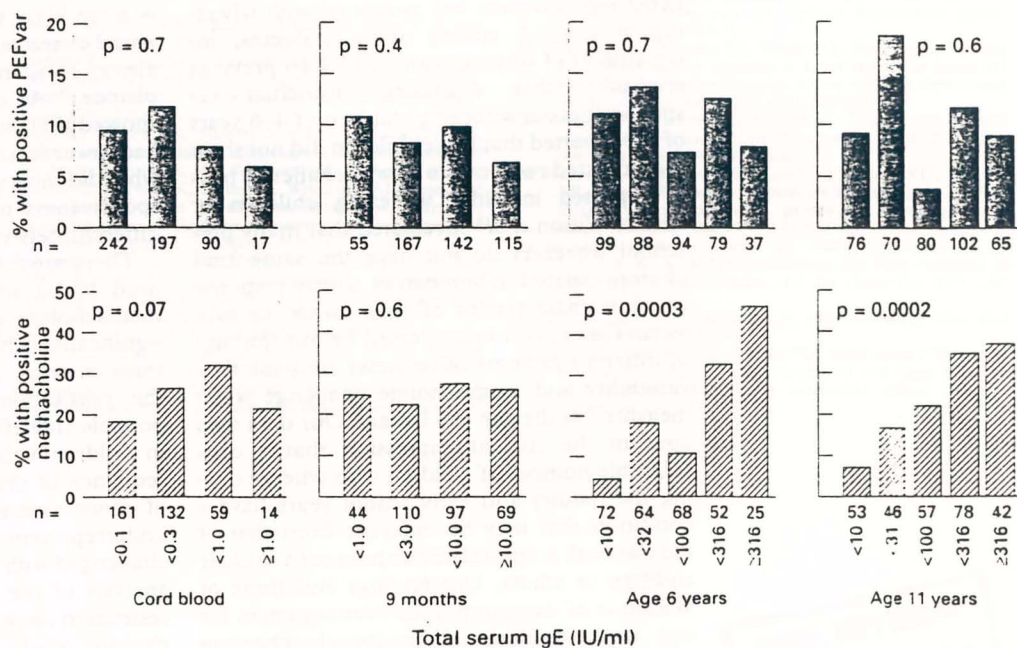


Figure 1 Proportion of subjects with positive peak flow variability (PEFvar) or positive methacholine challenge response in relation to serum IgE levels measured at different ages. The numbers of children (n) tested for each IgE level are displayed under the bars on each of the graphs. p values for trend within groups were determined by the χ^2 test.

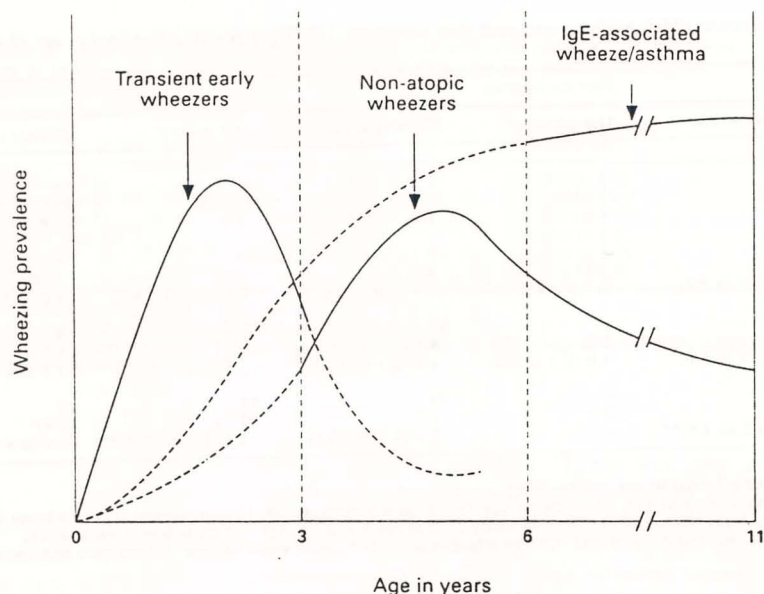


Figure 2 Hypothetical yearly peak prevalence of wheezing for the three different wheezing phenotypes in childhood. Prevalence for each age interval should be the sum of the areas under each curve. This classification of wheezing phenotypes should not imply groups are exclusive. Dashed lines suggest wheezing can present different curve shapes due to many different factors including overlap of groups. Modified from Wilson.³⁰

($p=0.07$) at birth and highly correlated with serum IgE levels measured at ages 6 ($p<0.001$) and 11 ($p<0.0001$).

Discussion

Both methacholine hyperresponsiveness and positive peak flow variability when measured at age 11 were associated with persistent wheezing during the school years (ages 6 and 11). Increased prevalence of positive peak flow variability was also observed in a group of children who wheezed at age 6 but not at age 11 and who were predominantly non-atopic. Methacholine hyperresponsiveness was associated with wheezing at age 11 among atopic subjects, independent of wheezing at age 6. Two previous studies^{9,24} that examined bronchial responsiveness in wheezing children of 4–6 years of age reported that these children did not show the expected response to airway challenge tests as reported in older wheezing children or adults. Wilson *et al.*⁸ speculated that many preschool wheezers do not have the same kind of atopy-related inflammatory airway response which is characteristic of older asthmatic subjects. This notion is supported by our findings of different patterns of response for peak flow variability and methacholine challenge when measured at the age of 11 years. Our data thus confirm the clinical impression that a considerable number of children who wheeze during the toddler and early school years have a condition that may be different from that of the classical, atopy-related asthma seen in older children or adults. Our findings and those of Wilson *et al.* have important consequences for our understanding of childhood wheezing which appears to be a heterogeneous group of conditions with a common final pathway represented by recurrent airway obstruction.

Our data do not allow us to define the nature of the alteration in airway dynamics that was present in the non-atopic subjects who had positive peak flow variability at age 11, wheezing around the age of 6, but who were not wheezing at age 11. Peak flow variability was unrelated to skin test reactivity to allergens measured at ages 6 and 11 and to serum IgE levels measured in cord blood and at ages 9 months, 6 years, and 11 years. Conversely, methacholine responsiveness was strongly associated with skin test reactivity to allergens and with total serum IgE levels as measured both concurrently with methacholine measurements and five years earlier at age 6 (fig 1). It thus appears that methacholine responsiveness and peak flow variability identify different types of abnormal airway behaviour.¹³ This is in agreement with earlier findings by Siersted *et al.*^{19,25} who reported that some children with asthma related symptoms but no asthma diagnosis had increased peak flow variability but not methacholine hyperresponsiveness. Thus, it is tempting to speculate that perhaps environmental stimuli such as viruses or tobacco smoke may alter airway dynamics and cause a syndrome of less persistent wheezing through mechanisms which regulate airway tone independently of IgE mediated inflammation.

We have previously reported that the main risk factor for transient early wheezing (wheezing up to age 3 but not after) is a lower level of airway function which can already be detected shortly after birth,²⁶ tracks along individual "growth curves", and remains low at age 6.²⁷ In the present study we observed that this same group of children showed no increased prevalence of methacholine hyperresponsiveness or positive peak flow variability, both measured at age 11. It thus appears that increased airway lability is not the main factor responsible for the lower levels of lung function observed in these children. The decreased lung function is more likely to be the consequence of mechanical characteristics of the lung such as altered airway resistance or increased dynamic compliance.²⁸ As in our population, Stick *et al.*²⁹ showed that children who wheezed in early life had lower levels of lung function than children who did not wheeze, but that bronchial responsiveness to histamine challenge was not different between these two groups.

There are some limitations in our study that need to be addressed. We did not perform methacholine tests in children with a history of significant asthma symptoms in the previous three months. More recent data suggest that this precaution may have overestimated the possible side effects of methacholine challenge in children with active asthma. The main consequence of this restriction was that a subset of more severely ill wheezers ($n=78$) were underrepresented in the sample of children challenged with methacholine (table 1). A close analysis of the possible consequences of this restriction on our results suggests that our conclusions would not have changed had we included the subjects with more recent wheezing symptoms in our study. Indeed, the associations between methacholine and wheeze at age 11,

atopic markers, sex, and current asthma were all significant among subjects included in this study and would probably have been stronger had we not excluded subjects with more recent asthma symptoms. Methacholine hyperresponsiveness was marginally associated with wheezing both at ages 3 and 6 among skin test positive subjects (table 4). This association would probably have been stronger had the more severe wheezers been tested for methacholine at age 11 since this group has the highest risk of continuing persistent wheeze. However, the exclusion criteria did not affect subjects who were wheezing at age 6 but who were not wheezing at age 11 so the low prevalence of positive methacholine tests in this group cannot be explained by selection bias. Finally, peak flow variability was measured in all cooperative subjects independent of symptoms so no bias with respect to symptoms was present in this group; in addition, the results were similar when the analysis for peak flow variability was restricted to the group who also performed methacholine tests.

In summary, there are at least three different wheezing phenotypes associated with different risk factors which co-exist during the first 11 years of life. We have identified these wheezing phenotypes as "transient early wheezing", "non-atopic wheezing" of the toddler and early school years, and "IgE-associated wheeze/asthma" (fig 2). These phenotypes coincide with the three groups of wheezing children previously described by Wilson.³⁰ Our data suggest that, whereas the first syndrome is mainly associated with lower levels of lung function which persist throughout childhood,³¹ the second group is mainly associated with increased peak flow variability long after wheezing symptoms have ceased – that is, at age 11 in this study. IgE associated wheeze/asthma, on the other hand, may exist at any age during childhood and is related to the known combination of atopy, increased responsiveness to methacholine, and increased peak flow variability.

This study was supported by NHLBI SCOR grants nos HL 14136 and HL 56177.

- 1 Christie G, Helms P. Childhood asthma: what is it and where is it going? *Thorax* 1995;50:1027-30.
- 2 Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, and the Group Health Medical Associates. Asthma and wheeze in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.
- 3 Hopp RJ, Bewtra AK, Nair NM, Watt GD, Townley RG. Methacholine inhalation challenge studies in a selected pediatric population. *Am Rev Respir Dis* 1986;134: 994-8.
- 4 Salome CM, Peat JK, Britton J, Woolcock AJ. Bronchial hyperresponsiveness in two populations of Australian schoolchildren. I. Relation to respiratory symptoms and diagnosed asthma. *Clin Allergy* 1987;17:271-81.
- 5 Pattemore PK, Asher MI, Harrison AC, Mitchell EA, Rea HH, Stewart AW. Ethnic differences in prevalence of asthma symptoms and bronchial hyperresponsiveness in New Zealand children. *Thorax* 1989;44:168-76.
- 6 Josephs LK, Gregg I, Mullee M, Holgate ST. Non specific bronchial reactivity and its relationship to the clinical expression of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:350-7.
- 7 Pattemore PK, Asher MI, Harrison AC, Mitchell EA, Rea HH, Stewart AW. The interrelationship among bronchial hyperresponsiveness, the diagnosis of asthma, and asthma symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:549-54.
- 8 Wilson NM, Bridge P, Silverman M. Bronchial responsiveness and symptoms in 5-6 year old children: a comparison of a direct and indirect challenge. *Thorax* 1995;50:339-45.
- 9 Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD. Relationships of bronchial responsiveness assessed by methacholine to serum IgE, lung function, symptoms, and diagnosis in 11 year old New Zealand children. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:376-85.
- 10 Peat JK, Woolcock AJ. Sensitivity to common allergens: relation to respiratory symptoms and bronchial responsiveness in children from three different climatic areas of Australia. *Clin Exp Allergy* 1991;21:753-81.
- 11 Clifford RD, Radford M, Howell JB, Holgate ST. Prevalence of atopy and range of bronchial response to methacholine in 7 and 11 year old school-children. *Arch Dis Child* 1989; 64:1126-32.
- 12 Quackenboss JJ, Lebowitz MD, Kryzanowski M. The normal range of diurnal changes in peak expiratory flow rates. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:323-30.
- 13 Brand PLP, Postma DS, Kerstjens HAM, Koetner GH, and the Dutch CNSLD study group. Relationship of airway hyperresponsiveness to respiratory symptoms and diurnal peak flow variation in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:916-21.
- 14 Clough JB, Williams JD, Holgate ST. Effect of atopy on the natural history of symptoms, peak expiratory flow, and bronchial responsiveness in 7 and 8-year-old children with cough and wheeze. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:755-60.
- 15 Higgins BG, Britton JR, Chinn S, Jones TD, Jenkinson D, Burney PGJ, et al. The distribution of peak expiratory flow variability in a population sample. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1368-72.
- 16 Higgins BG, Britton JR, Chinn S, Cooper S, Burney PGJ, Tattersfield AE. Comparison of bronchial reactivity and peak flow variability measurements for epidemiologic studies. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:588-93.
- 17 Taussig LM, Wright AL, Morgan WJ, Harrison HR, Ray CG, and the Group Health Medical Associates. 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: 1219-31.
- 18 Wright AL, Taussig LM, Ray CG, Harrison HR, Holberg CJ. The Tucson children's respiratory study. II. Lower respiratory tract illness in the first years of life. *Am J Epidemiol* 1989;129:1232-46.
- 19 Siersted HC, Hansen HS, Hansen N-C, Hyldebrandt N, Moostgard G, Oxhøj H. Evaluation of peak expiratory flow variability in an adolescent population sample. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:598-603.
- 20 Quanjar PH, Lebowitz MD, Gregg I, Miller MR, Pedersen OF. Peak expiratory flow: conclusions and recommendations of a working party of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1997;10(Suppl 24):2s-8s.
- 21 Yan K, Salome, Woolcock AJ. Rapid method for measurement of bronchial responsiveness. *Thorax* 1983;38:760-5.
- 22 Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and apparently normal children. *N Engl J Med* 1991;325: 1067-71.
- 23 Halonen M, Stern D, Lyle S, Wright A, Martinez F. Relationship of total serum IgE levels in cord and 9-month sera of infants. *Clin Exp Allergy* 1991;21:235-41.
- 24 Adachi Y, Murakami G, Matsuno M, Adashi Y, Kayahara M, Okada T, et al. Yoshizumi A. Longitudinal study of bronchial hyperactivity in preschool children with bronchial asthma. *Ann Allergy* 1992;68:261-6.
- 25 Siersted HC, Mostgaard G, Hyldebrandt N, Hansen HS, Boldsen J, Oxhøj H. Interrelations between diagnosed asthma, asthma-like symptoms, and abnormal airway behaviour in adolescence: the Odense Schoolchild Study. *Thorax* 1996;51:503-9.
- 26 Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg C, Taussig LM. Initial airway function is a risk factor for recurrent wheezing respiratory illnesses during the first three years of life. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:312-16.
- 27 Morgan WJ, Martinez FD, Wright AL, Taussig LM. Forced expiratory flow tracks from infancy to six years of age. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:A508.
- 28 Hanrahan JP, Brown RW, Carey VJ, Castile RG, Speizer FE, Tager IB. Passive respiratory mechanics in healthy infants: effects on growth, gender and smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:670-80.
- 29 Stick SM, Arnott J, Turner DJ, Young S, Landau LI, Le Souef P. Bronchial responsiveness and lung function in recurrently wheezy infants. *Am Rev Respir Dis* 1991;144: 1012-15.
- 30 Wilson N. The significance of early wheezing. *Clin Exp Allergy* 1994;24:522-9.
- 31 Voter KZ, Henry MM, Stewart PW, Henderson FW. Lower respiratory illness in early childhood and lung function and bronchial reactivity in adolescent males. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:302-7.



Total Serum IgE and its Association with Asthma Symptoms
and Allergic Sensitization among Children

Duane L. Sherrill, Ph.D.
Renato Stein, M.D.
Marilyn Halonen, Ph.D.
Catharine J. Holberg, M.S.
Anne Wright, Ph.D.
Fernando D. Martinez, M.D.

Respiratory Sciences Center
University of Arizona, College of Medicine
Tucson, Arizona 85724

Address for Reprints: Duane L. Sherrill, Ph.D.
University of Arizona
College of Medicine
Respiratory Sciences Center
1502 N. Campbell Avenue
Tucson, AZ 85724-5030
Phone (520) 626-6379
FAX (520) 626-6970
E-mail duane@resp-sci.arizona.edu

Running Head: Serum IgE and Asthma Symptoms

This work supported by the U.S. NHLBI SCOR Grant HL14136 and NHLBI RO1 HL56177

File c: my document/ige.doc

ABSTRACT

Asthma and wheezing during childhood are associated with elevated total serum IgE and with allergic sensitization to local aeroallergens. However, little is known about the longitudinal relationship between total serum IgE and the development of wheezing and to allergic sensitization during childhood. This was the purpose of our investigation. Our study subjects were participants in the Tucson Children's Respiratory Study who had an IgE measurement in at least one of three surveys (at years 1, 6, and 11) and complete allergy skin tests during the latter two surveys. The children's phenotypes were categorized on the basis of skin test response (never, early, and late) and wheeze (never, early, late, and persistent). Repeated measures analyses were used allowing subjects to be included who had unequal numbers of IgE observations, (a total of 263 boys and 277 girls). We found that total serum IgE levels track with age - subjects with high serum IgE levels less than one year old continued to have high IgE levels at ages 6 and 11. Both persistent wheezing and early sensitization were associated with high serum IgE levels at all ages. Boys who were late or persistent wheezers or early or late sensitized, had high serum IgE levels as early as age 9 months, while only girls with persistent wheezing and early sensitization had elevated IgE levels at that age. Children who wheezed only in the first years of life and not after (i.e. the early wheezers) had serum IgE levels that were not different than non-wheezing children. Based on these findings we conclude that while total serum IgE tracks with age, children who are predisposed to persistent wheezing and early sensitization to local aeroallergens already have high levels of IgE at age 9 months. This suggests that the predisposition to respond to environmental stimuli through high levels of IgE precede early allergic sensitization, indicating there may be a common defect in the development of the immune system involving IgE production and early allergic sensitization.

Key Words: skin test, wheeze phenotypes, epidemiology, longitudinal, immunoglobulin E, allergy

INTRODUCTION

Although numerous epidemiological studies have shown strong associations between total serum IgE levels, skin test reactivity to aeroallergens, and asthma prevalence ⁽¹⁻⁸⁾, the nature of these associations is still not well understood. It has been proposed, for example, that non-cognate production of IgE, i.e., production of IgE that is not driven by one or a few specific allergens, is a significant inherited risk factor for the development of asthma ⁽⁵⁾. Burrows and co-workers have recently shown that subjects with a diagnosis of asthma have total serum IgE levels that are markedly higher than what would be expected based on the level of IgE observed in their parents. Accordingly, the high levels of total serum IgE observed in asthmatics could be largely explained by the tendency of asthmatics to produce more IgE as a consequence of the inflammatory process in the asthmatic airway ⁽¹⁾. Our own data from the Tucson Children's' Respiratory Study have shown that children who later develop persistent wheezing during childhood have increased IgE levels even prior to the development of symptoms. This is in contrast to children who wheezed only in the first few years of life and did not have increased IgE levels ⁽¹⁰⁾.

Recent studies by Peat and co-workers have further illustrated the complex relations between skin test reactivity to allergens and incidence of asthma ⁽⁶⁾. These authors found that early (before age eight years) but not late allergic sensitization to common aeroallergens was associated with increased risk for the development of bronchial hyperresponsiveness and asthma. Preliminary analyses of data from the Tucson Epidemiological Study of Obstructive Airway Disease (Sherrill, non-published results) confirm these findings and suggest that late allergic sensitization is associated with lower levels of IgE than early allergic sensitization. These results indicate that longitudinal approaches may be needed to determine the complex relationship between timing of allergic sensitization, longitudinal increases in total serum IgE levels in early life, and the different wheezing phenotypes during childhood.

Since it is well documented that IgE levels are strongly related to allergic sensitization and childhood asthma⁽¹⁻⁴⁾, the current longitudinal analyses examine how total serum IgE (as the dependent variable) changes over time in relation to allergic sensitization at ages six and eleven and to different wheezing phenotypes expressed during childhood.

METHODS

Subjects

Children who were eligible for this study were enrolled in the Tucson Children's Respiratory Study (CRS), between May 1980 and October 1984⁽¹¹⁾. Their parents were members of Group Health Associates, a large health maintenance organization in Tucson, Arizona, and were contacted shortly after their children were born regarding participation in the CRS study. Informed consent was obtained from the parents of 1246 newborns. Children selected for these analyses were required to have at least one IgE measurement in one of three surveys (at year 1, 6, and 11), to have complete allergy skin tests during the latter two surveys, and to have complete responses to specific questionnaires concerning respiratory health.

Total Serum IgE Analyses

Total serum IgE levels were measured from blood obtained during the year-1, year-6, and year-11 surveys. Sera were frozen at -80°C until assayed, and IgE levels were assayed by the paper radioimmunosorbent test (PRIST) using commercially available kits (Pharmacia Diagnostics, Piscataway, NJ). As previously described⁽¹²⁾, the assay threshold was regarded as 0.1 IU/ml. Each sample was assayed in duplicate and the mean of the two IgE values was used in the analyses.

Since the distributions of the raw IgE values tend to be heavily skewed⁽¹³⁾ they were log-transformed for analyses. Tables listing results from IgE analyses were converted back to original units (IU).

Allergy Skin Test

During year-6 and year-11 surveys, children received allergy skin prick tests to seven aeroallergens common in the Tucson area (house dust mix, olive, Bermuda grass, mulberry, mesquite, careless weed, and *Alternaria*). Histamine and a control consisting of 50% glycerine were also applied. Wheal size was recorded as the sum of the two diameters at right angles to each other, in millimeters.

Subjects were considered to be skin test positive at any survey if the wheal size of any allergen was greater than 2mm after subtraction of the control value. Children who were skin test positive at the year-6 survey were classified as being "early-sensitized" while those who were skin test negative at the year-6 survey but skin test positive at the year-11 survey were classified as being "late-sensitized". Subjects who were skin test negative during both surveys were considered "non-sensitized". Children who were not skin tested at age 11 but were skin test negative at age 6 were excluded from analysis.

Respiratory Symptoms

Questionnaires regarding respiratory health of the children were completed during the year-3, year-6, and year-11 surveys. Among other questions, parents were asked whether the child's "chest had ever sounded wheezy or whistling apart from colds" and how frequently the child wheezed. Children were considered to be currently wheezing during any survey in which the parents reported one or more wheezing episodes during the past year. In the current analyses four phenotypes of wheeze were established. Children who were wheezing during the year-3 survey and not wheezing thereafter, were classified as "early wheezers"; children who were non-wheezers at the year 3 survey but started wheezing at either the year 6 or year 11 surveys were considered "late wheezers"; children who were non-wheezers or current wheezers at all three surveys were classified as "never" and "persistent" wheezers, respectively. Children who did not have responses to the wheeze

question in all three surveys were excluded from analyses.

Statistical Methods

The longitudinal IgE data were analyzed using repeated measures analysis. Because of missing observations we used a random effects model (REM).⁽¹⁴⁾ Jones et al.^(15,16) has recently demonstrated how the REM procedure, which is generally used for unequally spaced continuous longitudinal data, can also be used for equally spaced data by implementing a "saturated" model. The saturated model fits polynomials which have order one less than the number of time points to each subgroup. For our data this meant fitting a quadratic or second order polynomial since there were three time points. A saturated model allows every time point for each subgroup to have a different mean value. The likelihood ratio test, which was calculated as the change in $-2\ln(\text{likelihood})$ between nested models, was used to test for significant differences between groups and group by time interactions. For example, to test if the mean IgE values of persistent wheezers had a different temporal pattern than that of the reference group, a model fitting both groups with quadratic polynomials would be compared to a reduced model where the reference group was fitted with a quadratic polynomial and the persistent wheezers were fit with a model containing only an intercept term. Here, a significant increase in $-2\ln(\text{likelihood})$ between these two models would indicate that persistent wheezers have a significantly different group by time interaction or temporal pattern than the reference group. If the change in $-2\ln(\text{likelihood})$ was not significant but the intercept coefficient estimated for persistent wheezers was, this would imply that the two groups had similar temporal patterns in their mean IgE values but that the persistent wheezers differed by a constant amount at each time point. The intercept coefficient would thus be an estimate of this difference, which we call a significant group difference. If this latter intercept coefficient was not significantly different from zero this indicates no significant differences between the mean IgE values of persistent wheeze and the reference group, at any time points.

Three separate repeated measure analyses were performed on the IgE data. The first (Model 1) included only the variables of skin test sensitization, the second (Model 2) included only the wheeze phenotypes, and the third (Model 3) combined sensitization and the wheeze phenotypes and their appropriate two-way interaction terms. Since sensitization and wheeze were not assessed during the same surveys as IgE they were included in the REM analyses as fixed covariables. In other words, they could only be included as time dependent covariables if they were assessed during the same surveys as IgE. However, since there were only three time points, the sensitization and wheeze categories were exhaustive (i.e. they covered all possible combinations). Three different forms of within-subject covariance structures were considered for each REM analyses, first order auto-regressive, uncorrelated or independent, and the toplitz. The best fitting structure was determined by using Akaike Information Criteria (AIC) with the model fully saturated. For all analyses the uncorrelated covariance structure yielded the best overall fit.

Since it is known that both wheezing prevalence and serum IgE levels differ by sex⁽⁸⁾, we initially analyzed the data stratified by sex. However, if the stratified results were similar for both sexes, we then combined the two groups and included a sex indicator variable to obtain maximum statistical power. Results from the REM analyses are presented as mean and standard errors of the means, instead of as actual coefficients that are not always directly interpretable. Statistical hypotheses tests were two-tailed comparisons at the $\alpha=0.05$ significance level.

RESULTS

There were 263 boys and 277 girls who met the inclusion criteria. Table 1 shows descriptive statistics for these subjects. The average ages were similar for boys and girls, with mean estimates around 1, 6, and 11 years of age for those surveys where IgE measures were taken. Boys and girls had similar lengths of follow-up and numbers of observations. There were significantly more boys than girls who were sensitized early ($p < 0.002$) and more boys than girls with late and persistent wheeze symptoms ($p < 0.05$). The number of subjects who were sensitized late and reported either late or persistent wheezing was quite small (range 3-9). Approximately 30% of study participants had either one or three IgE assessments, and there were no significant differences between boys and girls in their distribution of number of samples.

Association between IgE and Skin Test Sensitization:

The results of fitting Model 1 to the IgE data are listed in Table 2 and illustrated in Figure 1. For all sensitization groups, ("non", late, and early), mean IgE values increased with age. Boys, who were sensitized, either early or late, had significantly higher IgE levels compared to non-sensitized boys at all ages, and also had significantly higher IgE levels than sensitized girls at all ages ($p < 0.02$) (Figure 1). Interestingly, IgE levels at age one year of boys were significantly higher ($p \leq 0.01$) in both sensitized sub-groups as compared to the non-sensitized subgroup. At both ages 6 and 11, early-sensitized boys had significantly higher IgE levels than late-sensitized boys. Among girls (Figure 1), there were no differences in mean IgE related to sensitization at age one, and only the early-sensitized subjects had significantly ($p \leq 0.05$) elevated IgE levels at age 6, compared to the non-sensitized. By age 11, both early- and late-sensitized girls had significantly ($p \leq 0.01$) elevated IgE values, compared to non-sensitized girls. As in boys, early-sensitized girls also had significantly higher mean values than late-sensitized.

Association between IgE and Wheeze Phenotype:

The stratified REM results for the wheeze phenotypes (Model 3, Table 3) showed similar temporal patterns for both sexes thus, data for both boys and girls were combined for subsequent analyses with inclusion of a sex indicator variable. The results show that boys and girls classified as having late or persistent wheezing symptoms had significantly higher mean IgE values than those with no wheezing symptoms. For boys and girls there were no significant differences in mean IgE values between the early wheeze and the non-wheezing category, even in the combined analysis where maximal power was achieved. Examination of the mean plots (Figure 2), indicate that there were no differences in mean IgE related to wheeze at age 1. At ages 6 and 11, both boys and girls with persistent and late wheeze had significantly higher IgE levels than did non-wheezing children. Children reporting persistent wheezing had significantly ($p \leq 0.05$) higher IgE values than late wheezing children at age 6, but not at age 11, again for both sexes. Temporal patterns of IgE with age were similar for boys and girls. However, boys had significantly higher IgE levels than girls, in all wheezing categories

Association between IgE, Wheeze, and Skin Test Sensitization:

The results of fitting Model 3 are listed in Tables 4-5. This model was used to determine if the effects found separately in models 1 and 2 were indeed independent or if they behaved in a synergistic manner. For boys (Table 4), the main effects of wheeze and sensitization, which were statistically significant in independent analysis remained significant in the combined analysis. However, the expected mean IgE values, as a main effect related to wheeze, were substantially less after adjusting for sensitization, whereas in contrast, the mean IgE values related to sensitization were essentially unchanged. For example, Model 2 yields mean estimates of "unadjusted" effect of persistent wheeze among boys of 6.62, 107.77, and 179.47, respectively for ages 1, 6, and 11 (Table 3). Using Model 3 to "adjust" for sensitization yields means of 5.70, 18.54, and 24.53, for persistent

wheezers at the same ages (Table 4). This suggests that the association between IgE and wheezing is explained in part by sensitization. Among boys (Table 4), late-sensitization with late or persistent wheeze interactions were not significant, but the interactions between early sensitization and late and persistent wheezing were. These significant interaction terms suggest that late or persistent wheezing boys who were sensitized early had expected mean IgE levels that were different than one would predict based solely on the main effects of sensitization and wheeze alone (Models 1 and 2). It is important to note that boys who were sensitized early had, independently, IgE levels almost as high as persistent wheezers who were also sensitized early (Figure 3). Mean IgE for boys who were both sensitized early and classified as persistent wheezers did not differ significantly from persistent wheezers at age one year, but increased dramatically by age 6 and changed very little thereafter.

The results of fitting Model 3 to the girls (Table 5) showed that after adjusting for sensitization, the main effects of wheeze were no longer statistically significant and the interaction of early sensitization and persistent wheeze was of borderline significance ($p = 0.06$). The plot of these results (Figure 3) illustrates that the changes in IgE between ages 1 and 6 for early sensitized persistent wheezing girls were not as dramatic as those observed among boys, but by age 11 years, mean IgE levels for early sensitized persistent wheezing boys and girls were comparable. Persistent wheezing early-sensitized girls had higher IgE levels than all other sub-groups, at all ages. This was statistically significant at age one ($p < 0.02$), based on a single time point comparison. In this respect, the mean IgE values of this sub-group behave similarly to those of their male counterparts. No other interaction terms were statistically significant for girls. As found with boys, the mean IgE values estimated for sensitization were essentially unchanged by the inclusion of wheeze phenotypes in the analysis, while those for wheeze were reduced.

Since other analyses in this study population have suggested ethnic differences in the asthma prevalence rates and possibly IgE levels, we added ethnicity indicator variables for Hispanic parents to the best fitting Model 3, which showed no statistically significant differences related to ethnicity.

DISCUSSION

Several prior studies have shown that asthma and recurrent wheezing during childhood are strongly associated with elevated serum IgE and with allergic sensitization to local aeroallergens (2,4,9). Recent studies have also shown that total serum IgE is elevated as early as 9 months of age in subjects who develop persistent wheezing (10). However, no previous studies have assessed the relationship of increased total serum IgE during childhood to the patterns of development of wheezing symptoms and allergic sensitization. In this longitudinal analysis, we examined the association of timing of skin test sensitization and development of wheezing symptoms to the increase of total serum IgE levels during childhood.

We found that total serum IgE levels during childhood track markedly with age. Subjects who had high levels of serum IgE at age nine months had higher levels of serum IgE than their peers at age six and eleven years. This was true in spite of the fact that, as has been shown by others (18), children do not usually have detectable levels of specific IgE against local aeroallergens before the age of three (although they may be sensitized to other allergens such as food). This finding suggests that genetic factors may control total serum IgE levels (19) and that a pattern of increased IgE production in response to environmental antigens is established very early in life and persists through childhood. In support of this, subjects who had persistent wheezing (i.e., boys and girls who were wheezing at the age of nine months and would continue wheezing at ages six and eleven) and who would become sensitized early in life (defined in this study as being skin test positive to at least one aeroallergen at age six) showed the highest levels of serum IgE throughout childhood.

Our results also emphasize the importance of timing of allergic sensitization. Children who became sensitized to common aeroallergens in our area by the age of six years already had high levels of IgE at nine months. Among males this was true irrespective of wheezing status, but not among females. Our study therefore suggests that the predisposition to respond to environmental

stimuli with high levels of IgE precedes allergic sensitization and, thus, that both high IgE production and early allergic sensitization may be the result of a common defect in the development of the immune system. Interestingly, Peat and coworkers⁽⁶⁾, found that children with early onset positive skin test reactivity (by age eight to ten years) were at higher risk of having bronchial hyperresponsiveness, a diagnosis of asthma, and persistence of wheeze by age twelve as compared to children who became sensitized at a later age. Thus, it appears that both early allergic sensitization⁽⁶⁾ and high production of IgE in early life⁽¹⁰⁾ may be important risk factors for the development of asthma. Again, this implicates the pattern of development of the immune system in early years as an important determinant of a predisposition to asthma in childhood.

Our data also suggest that boys have a greater predisposition than girls do toward developing increased serum IgE levels early in life. Boys who were early-sensitizers, and were either late or persistent wheezers, had the highest serum IgE levels of all subgroups at ages six and eleven (Figure 3). Interestingly, as early as age nine months all of the wheezing and sensitization subgroups showed serum IgE levels above those of non-wheezers and early wheezers (reference group). In contrast, only girls who were persistent wheezers and showed early sensitization had increased serum IgE levels in their first year. Our data do not offer any explanation of why serum IgE levels differ between males and females, but this difference may offer a partial explanation of the higher prevalence of asthma in boys than in girls in the first decade of life^(24,25).

We were unable to detect any significant elevation of IgE levels among children who wheezed at the year-three survey but not at later surveys (early wheezers). Wheezing at this early age, at least for the majority of children, appears to be a non-allergic condition. In a study of wheezing lower respiratory tract illnesses (LRI) during the first years of life in this same population⁽²⁶⁾, we also concluded that early wheezing did not appear to be an allergic condition. There is also a possibility that we did not have had enough subjects in this subgroup, and therefore may not have

had the necessary statistical power to demonstrate an association.

It is important to note that wheezing in early life is most often due to viral lower respiratory infections and the nature of the association between viral infections in early life and subsequent sensitization has not been clearly elucidated (20-22). The idea that viral infections in early life can prime the immune system (in susceptible subjects) is not new. Welliver et al (23) showed that children who had bronchiolitis in the first 6 months of life and persistent wheezing up to age 4 had higher levels of RSV-specific IgE at the time of the infection. This suggests that there is a selected group of infants with lower respiratory illnesses who are more prone to developing virus-specific IgE and having persistent wheezing. Our data also suggest that early wheezing is indeed associated with higher IgE levels, especially in conjunction with early sensitization. If the latter is the cause of early and/or persistent wheeze or if infections associated with wheezing cause more sensitization and higher IgE remains to be clarified.

Although the elevated IgE levels observed among children who were both sensitized early and persistent wheezers were statistically significant at 9 months, the large amount of variability seen clinically among individual patients would not make a high IgE level, by itself, a good measure for selecting subjects either at high risk for developing wheezing symptoms or for developing early sensitization.

One of the assumptions of the REM analyses is that missing observations are “missing completely at random”. To test this assumption we used a procedure recently published by Park et al ⁽²⁷⁾ which defines indicator variables for each missing data pattern and then fits an extended model which includes these indicator variables and covariables of interest. Since none of these missing data indicator variables were significantly different from zero, we can assume the data are in fact missing completely at random.

In summary, we have demonstrated that both time of sensitization and wheezing phenotypes are significant predictors of elevated IgE levels among children. When analyzed longitudinally, there is significant tracking of IgE with age, and children who are predisposed to persistent wheezing and early sensitization to local aeroallergens already have high levels of IgE at age 9 months.

REFERENCES

1. Burrows B, Martinez FD, Cline MG, Lebowitz MD. The relationship between parental and children's serum IgE and asthma. *Am Rev Respir Crit Care Med* 1995; 152(5): 1497-500.
2. Freidhoff LR, Marsh DG. Relationship among asthma, serum IgE and skin test sensitivity to inhaled allergens. *Int. Arch Allergy Immunol* 1993; 100:355-61.
3. Freidhoff LR, Meyers D, Marsh D. A genetic epidemiologic study of human immune responsiveness to allergens in an industrial population. II. The associations among skin sensitivity, total serum IgE, age and sex in a stratified random sample. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:490-99.
4. Sears MR, Burrows B, Flawndry EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *New Eng J Med* 1991; 325:1067-71.
5. Sunyer J, Anto JM, Castellsague J, Soriano JB, Roca J. Total serum IgE is associated with asthma independently of specific IgE levels. *Eur Respir J* 1996; 9:1880-84.
6. Peat JK, Salome CM, Woolcock AJ. Longitudinal changes in atopy during a 4-year period, relation to bronchial hyperresponsiveness and respiratory symptoms in a population sample of Australian school children. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:65-74.
7. Backer V, Ulrik CS, Wendelboe D, Bach-Mortensen N, Hansen KK, Laursen EM, Dirksen A. Distribution of serum IgE in children and adolescents aged 7 to 16 years in Copenhagen, in relation to factors of importance. *Allergy* 1992; 47:484-89.
8. Barbee R, Halonen M, Lebowitz MD, Burrows B. Distribution of IgE in a community population sample: Correlation with age, sex and allergen skin test reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68:106-11.

9. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline G. Association of asthma with serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. *N Eng J Med* 1989; 320:271-7.
10. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. . Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995; 332:133-8.
11. Taussig LM, Wright AL, Morgan WJ, Harrison HR, Ray CG, Group Health Medical Associates. 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; 129:1219-31.
12. Halonen M, Stern D, Lyle S, Wright AL, Taussig LM, Martinez FD. Relationship of total serum IgE levels in cord and nine-month sera of infants. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:235-41.
13. Burrows B, Halonen M, Barbee RA. . The relationship of serum immunoglobulin E to cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis* 1981;124:523-5.
14. Laird NM, Ware JH. Random effects models for longitudinal data. *Biometrics* 1982; 38:963-74.
15. Jones RH. Longitudinal data with serial correlation: A statespace approach. 1993; Chapman and Hall, London.
16. Jones RH, Boadi-Boateng F. Unequally spaced longitudinal data with AR(1) serial correlation. *Biometrics* 1991; 47:161-75.
17. Barbee RA, Kaltenborn W, Lebowitz MD, Burrows B. Longitudinal changes in allergen skin test reactivity in a community population sample. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79:16-24
18. Heymann PW, Rakes GP, Hogan RD, Ingram JM, Hoover GE, Platts-Mills TA. Assessment of eosinophils, viruses and IgE antibody in wheezing infants and children. *Intl Arch All Immunol* 1995;107:(1-3):380-2

19. Martinez FD, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Wright AL, Taussig LM. Evidence for Mendelian Inheritance of Serum IgE Levels in Hispanic and Non-Hispanic White Families. *Am J Hum genet.* 1994; 55:555-565.
20. Sears MRG, Herbison P, Holdaway CJ, Hewitt EM, Flannery and Silva PA. The relative risk of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:418-35.
21. Cogswell JJ, Halliday DF, Alexander JR. Respiratory infections in the first years of life in children at risk for developing atopy. *Br Med J* 1982; 284:1011-13.
22. Simms DG, Gardner PS, Weightman D, Turner MW, and Soothill JH. Atopy does not predispose to RSV bronchiolitis or post-bronchiolitic wheezing. *Br Med J* 1981; 282:2086-88.
23. Welliver RC, Sun M, Rinaldo D, Ogra PL. Predictive values of respiratory syncytial Virus specific IgE responses for recurrent wheezing following bronchiolitis. *J Pediatr* 1986; 109:776-80.
24. Horwood CJ, Fergusson DM, Shanon FT. Social and familial factors in the development of early childhood asthma. *Pediatrics* 1985; 75:859-68.
25. Holberg CJ, Elston RC, Halonen M, Wright AL, Taussig LM, Morgan WJ, Martinez FD. Segregation Analysis of Physician-Diagnosed Asthma in Hispanic and Non-Hispanic White families. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154: 144-150.
26. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995; 332:133-8.
27. Park, T, Lee SE. A test of missing completely at random for longitudinal data with missing observations. *Statist Med.* 1997; 16:1859-71.

TABLE 1

DESCRIPTIVE STATISTICS FOR SUBJECTS WHO HAD AT LEAST ONE IgE ASSESSMENT
& WHOSE WHEEZING STATUS COULD BE DETERMINED IN ALL 3 SURVEYS

	BOYS	GIRLS
N	263	277
AGE (yr.)*		
SURVEY YR. 1	0.84 ± 0.21	0.88 ± 0.24
SURVEY YR 6	6.10 ± 0.58	5.98 ± 0.66
SURVEY YR 11	10.68 ± 0.46	10.74 ± 0.46
TOTAL FOLLOW-UP (yr.)*	5.75 ± (4.39)	5.45 ± 4.48
MEAN # of OBSERVATIONS*	1.95 ± 0.77	1.90 ± 0.78
SENSITIZATION† (# Positive (%))		
EARLY**	103 (39.2)	73 (26.4)
LATE	36 (13.7)	34 (12.3)
WHEEZET† (# in Category (%))		
NEVER**	115 (43.7)	171 (61.7)
EARLY	29 (11.0)	25 (9.0)
LATE**	73 (27.8)	56 (20.2)
PERSISTENT**	46 (17.5)	25 (9.0)
INTERACTIONS (# in Category (%))		
LATE SENSITIZATION		
- by Late Wheeze	9 (3.4)	8 (2.9)
- by Persistent Wheeze	3 (1.1)	5 (1.8)
EARLY SENSITIZATION		
- by Late Wheeze	24 (9.1)	34 (12.3)
- by Persistent Wheeze	13 (4.9)	30 (10.8)
DISTRIBUTION OF # IgE SAMPLES		
One Sample	32%	35%
Two Samples	40%	38%
Three Samples	28%	27%

* Means ± Standard Deviation

† Count (percent)

** Chi Square $p < 0.05$

TABLE 2

MEAN IgE (IU) AND 95% CONFIDENCE INTERVAL
FOR SKIN TEST SENSITIZATION *

	SURVEY YEAR 1	SURVEY YEAR 6	SURVEY YEAR 11
GIRLS Sensitization			
NON	3.42 (2.76, 4.24)	16.12 (12.01, 21.63)	20.91 (15.58, 28.05)
LATE †	3.56 (2.18, 5.81)	26.31 (14.90, 46.45)	74.44 (43.00, 128.87)
EARLY †	3.90 (2.79, 5.44)	57.40 (38.03, 86.63)	177.68 (122.44, 257.86)
BOYS Sensitization			
NON	3.49 (2.65, 4.59)	11.59 (8.14, 16.49)	18.36 (12.65, 26.64)
LATE †	6.30 (3.93, 10.08)	36.97 (21.35, 63.99)	90.02 (50.99, 158.92)
EARLY †	6.49 (4.84, 8.71)	151.41 (108.51, 211.28)	242.26 (177.04, 331.49)

† - Statistically significant group and group by time differences compared to non-sensitized.

* Statistical comparisons made using saturated REM Model 1 (see statistical methods for more details)

TABLE 3

MEAN IgE (IU) AND 95% CONFIDENCE INTERVAL
FOR WHEEZE PHENOTYPES *

	SURVEY YEAR 1	SURVEY YEAR 6	SURVEY YEAR 11
GIRLS WHEEZE			
NON	3.19 (2.57, 3.96)	19.30 (14.96, 24.90)	34.47 (27.24, 43.61)
EARLY	2.34 (1.58, 3.46)	14.44 (9.57, 21.79)	25.79 (17.09, 38.92)
LATE †	3.94 (2.88, 5.38)	42.52 (26.05, 69.41)	101.49 (71.32, 144.43)
PERSISTENT†	4.81 (3.18, 7.25)	79.04 (48.42, 129.02)	130.32 (79.84, 212.72)
BOYS WHEEZE			
NON	4.39 (3.54, 5.45)	26.58 (20.60, 34.29)	47.47 (36.79, 61.24)
EARLY	3.29 (2.22, 4.86)	20.09 (13.31, 30.31)	35.87 (24.24, 53.09)
LATE †	5.42 (4.04, 7.27)	58.56 (41.15, 83.33)	139.77 (98.22, 198.90)
PERSISTENT †	6.62 (4.47, 9.80)	107.77 (67.33, 172.50)	179.47 (112.12, 287.26)

† - Statistically significant group and group by time interactions compared to non-wheezers.

* - Statistical comparisons made using saturated random effect Model 2 (see statistical methods for more details)

TABLE 4

MEAN IgE (IU) AND 95% CONFIDENCE INTERVAL
INCLUDING WHEEZE AND SKIN TEST SENSITIZATION AS MAIN EFFECTS
AND WHEEZE BY SENSITIZATION INTERACTIONS
FOR BOYS.**

	SURVEY YEAR 1	SURVEY YEAR 6	SURVEY YEAR 11
MAIN EFFECTS			
WHEEZE: Non	2.97 (2.17, 4.07)	9.78 (6.61, 14.47)	12.81 (8.65, 18.95)
Early	2.36 (1.42, 3.93)	7.92 (4.58, 13.72)	10.38 (6.00, 17.97)
Late †	4.48 (2.86, 7.03)	19.11 (9.43, 38.69)	54.60 (27.49, 108.42)
Persistent *	5.70 (2.93, 11.09)	18.54 (8.98, 38.29)	24.53 (12.11, 49.68)
SENSITIZATION:			
Early †	7.39 (4.53, 12.06)	116.75 (67.44, 202.11)	217.02 (132.95,354.25)
Late †	5.42 (3.13, 9.38)	28.50 (14.35, 56.60)	60.34 (30.99, 117.50)
INTERACTIONS			
EARLY SENS.			
X Late Wheeze †	5.37 (3.16, 9.11)	167.34 (98.57, 284.06)	259.82 (153.06,441.07)
X Persistent Wheeze †	7.24 (4.27, 12.30)	204.38 (111.32,375.25)	284.29 (157.91,511.83)
LATE SENS.			
X Late Wheeze	8.67 (3.52, 21.36)	57.40 (22.85, 144.20)	265.07 (97.55, 720.25)
X Persistent Wheeze	9.39 (3.26, 27.07)	48.91 (16.97, 140.95)	103.54 (34.55, 310.32)

† - Statistically significant ($p < 0.05$) group and group by time interactions compared to non-wheezers.

* - Statistical significant ($p < 0.05$) group differences compared to non-wheezers.

** - Statistical comparisons made using saturated random effect model 3 (see statistical methods for more details.)

TABLE 5

MEAN IgE (IU) AND 95% CONFIDENCE INTERVAL
INCLUDING WHEEZE AND SKIN TEST SENSITIZATION AS MAIN EFFECTS
AND WHEEZE BY SENSITIZATION INTERACTIONS
FOR GIRLS **

	SURVEY YEAR 1	SURVEY YEAR 6	SURVEY YEAR 11
MAIN EFFECTS			
WHEEZE: Non	3.42 (2.76, 4.24)	16.12 (12.01, 21.63)	20.91 (15.89, 27.51)
Early	2.59 (1.55, 4.30)	11.94 (6.90, 20.67)	15.80 (9.31, 26.82)
Late	4.85 (2.92, 8.08)	22.42 (13.21, 38.06)	29.67 (17.48, 50.36)
Persistent	3.00 (1.35, 6.71)	13.87 (5.97, 32.23)	18.36 (7.90, 42.64)
SENSITIZATION:			
Early †	3.90 (2.79, 5.44)	57.40 (38.03, 86.63)	177.68 (122.44,257.86)
Late †	3.56 (2.18, 5.81)	26.31 (14.90, 46.45)	74.44 (43.00, 128.87)
INTERACTIONS			
EARLY SENS.			
X Late Wheeze	3.78 (2.27, 6.29)	54.05 (30.62, 95.43)	172.43 (99.60, 298.51)
X Persistent Wheeze *	6.75 (3.40, 13.41)	97.51 (48.15, 197.47)	311.06 (153.61,629.92)
LATE SENS.			
X Late Wheeze	2.92 (1.31, 6.51)	21.54 (9.27, 50.04)	59.74 (25.72, 138.77)
X Persistent Wheeze	7.39 (1.77, 30.90)	55.15 (12.68, 239.85)	151.41 (36.21, 633.21)

† - Statistically significant group and group by time interactions compared to non-wheezers.

* - Borderline (p=0.06) statistically significant group differences compared to non-wheezers.

** - Statistical comparisons made using saturated random effect model 3 (see statistical methods for more details.)

FIGURE LEGENDS:

Figure 1.

Mean IgE and 95% confidence intervals for model 1, using repeated measures analyses (see text for details) for boys and girls. Children were considered early sensitized when they had at least one positive skin prick test at age 6, and late sensitized when they had at least one negative skin prick test followed by a positive skin prick test at age 11. Non-sensitized children had negative skin prick tests at both ages (reference population).

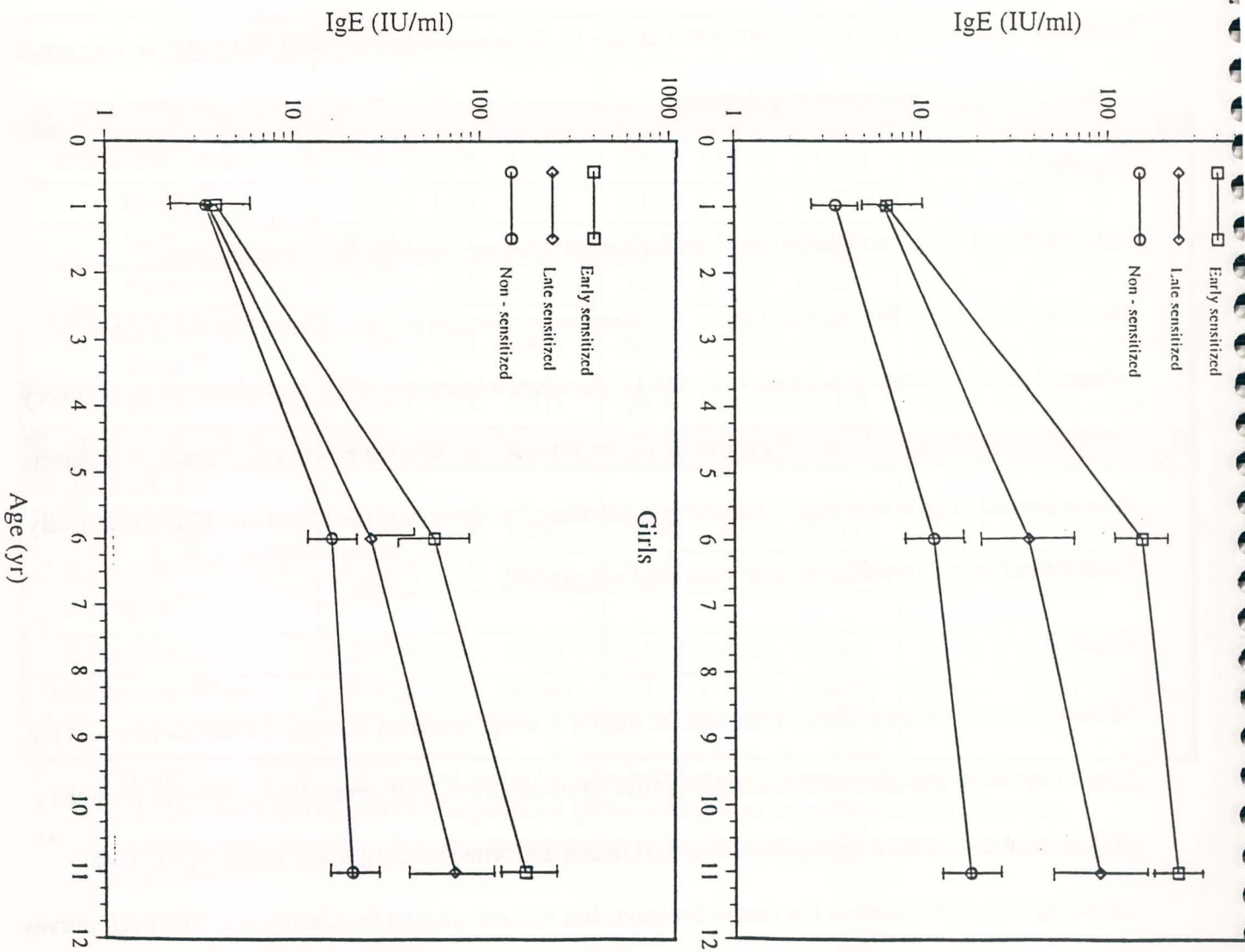
Figure 2.

Mean IgE and 95% confidence intervals for model 2, using repeated measures analyses (see text for details) for boys and girls. Children were considered persistent wheezers if they wheezed at all surveys (i.e. Years 1, 6, and 11), and late wheezers if they started wheezing at survey 6 or 11 but not before. Children not wheezing in any survey were the reference population. Subjects who wheezed only in the Year 1 survey and not after (i.e. early wheezers) did not differ statistically from the reference population, and were thus not plotted.

Figure 3.

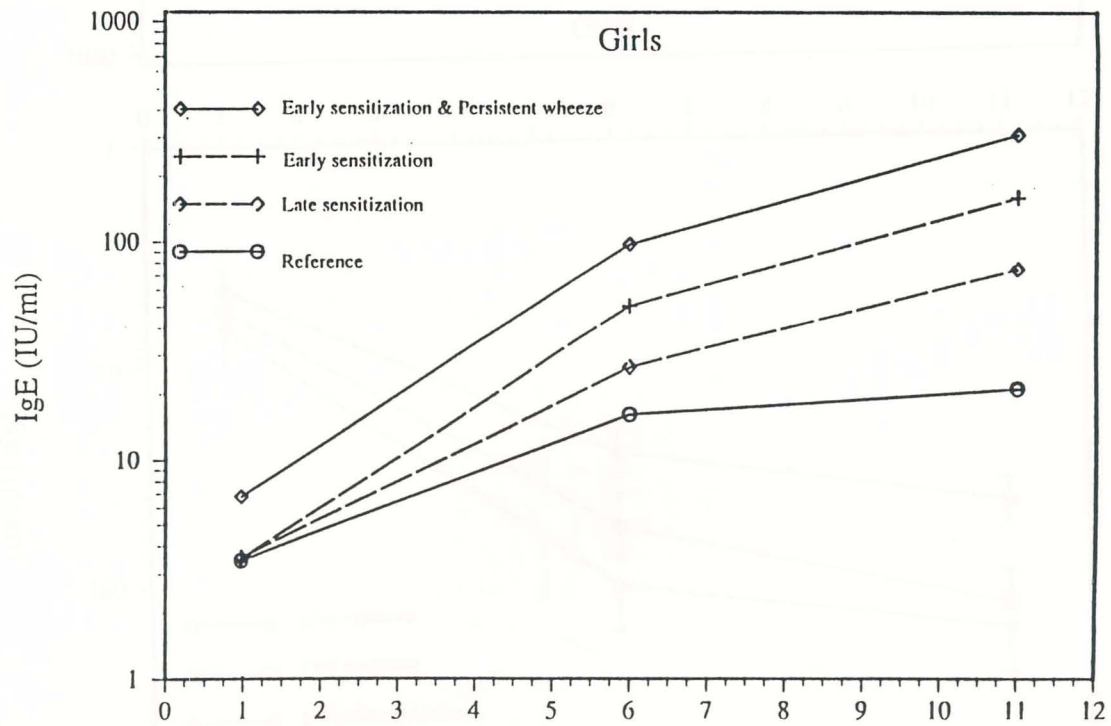
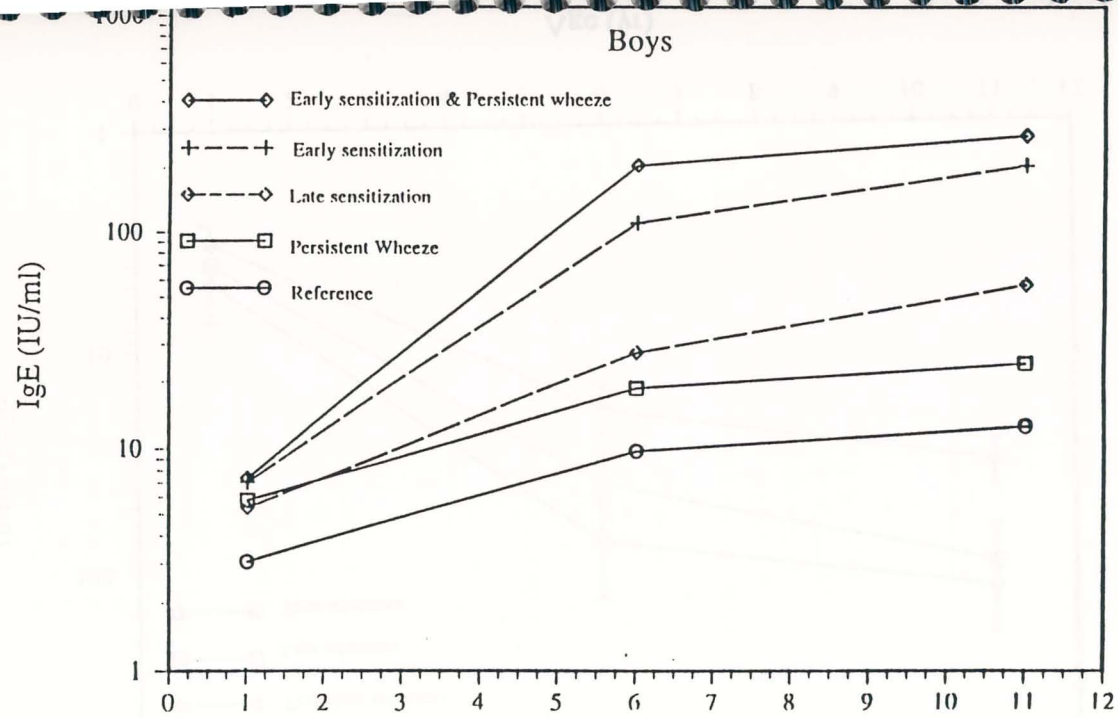
Mean IgE and 95% confidence intervals for model 3, using repeated measures analyses (see text for details) for boys and girls. Plots are of significant main effects and interactions resulting from the longitudinal analyses, which included both skin test and wheeze categories (Tables 4, 5). Late wheezing was significant in the model for boys, but was not plotted for clarity, (i.e. Their IgE curves overlapped with those of persistent wheezers.)

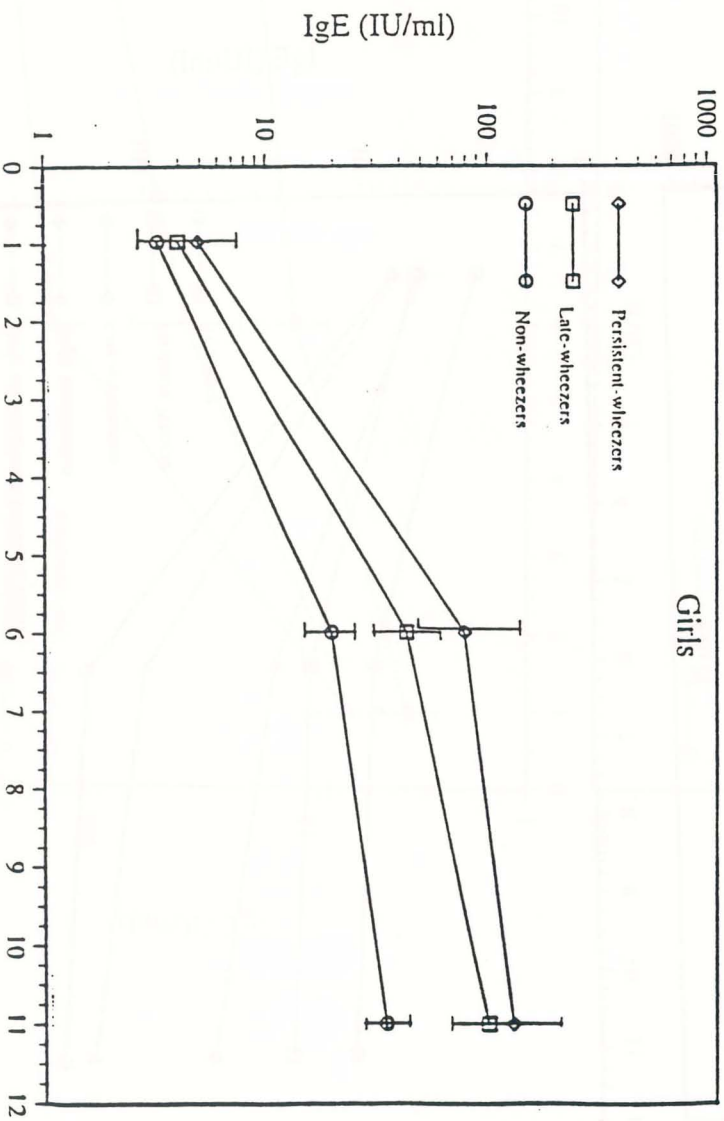
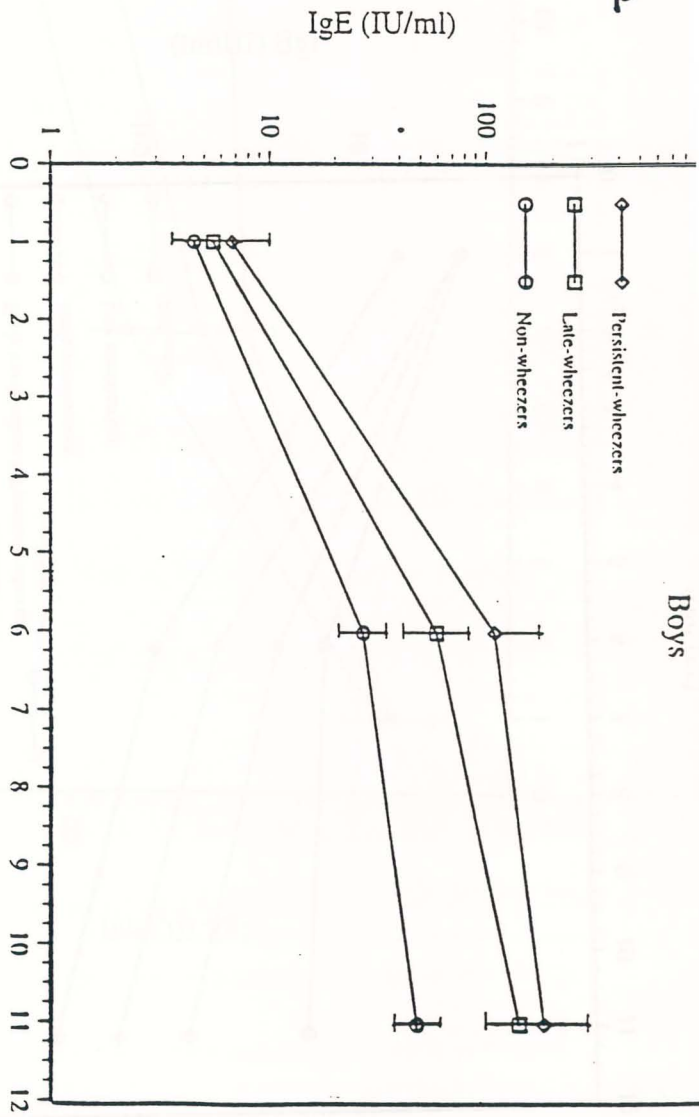
1975



BIBLIOTECA
FARMACIA

Figure 3





ANEXO 3

Cold Air Challenge at Age 6 and Subsequent Incidence of Asthma: A Longitudinal Study

EMILY CHAMBERLAIN, MARGIE S. MOULTON, JAMES A. SPICOTT, & JOHN W. STEIN
CITY OF SEATTLE, SEATTLE, AND KINGDOM OF NORWAY

Received 12 October 2004; accepted 12 February 2005

DOI: 10.1111/j.1365-3113.2005.03111.x

Objective: To determine whether exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study. **Design:** A population-based, longitudinal study of 10-year-old children in Seattle, Washington, USA, and their parents. **Setting:** The study was conducted in Seattle, Washington, USA. **Subjects:** The study included 10-year-old children and their parents who participated in the Seattle Children's Asthma Study. **Measurements and Main Results:** The study included 10-year-old children and their parents who participated in the Seattle Children's Asthma Study. The study included 10-year-old children and their parents who participated in the Seattle Children's Asthma Study. The study included 10-year-old children and their parents who participated in the Seattle Children's Asthma Study. **Conclusion:** Exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study.

Introduction: Asthma is a complex condition with a multifactorial aetiology. The aetiology of asthma is still unclear, but it is thought to be caused by a combination of genetic and environmental factors. Cold air is one of the environmental factors that is thought to be associated with asthma. The purpose of this study was to determine whether exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study.

Methods: The study included 10-year-old children and their parents who participated in the Seattle Children's Asthma Study. The study included 10-year-old children and their parents who participated in the Seattle Children's Asthma Study.

Results: The study included 10-year-old children and their parents who participated in the Seattle Children's Asthma Study. The study included 10-year-old children and their parents who participated in the Seattle Children's Asthma Study.

Conclusion: Exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study.

Conclusion: Exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study.

Conclusion: Exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study.

Conclusion: Exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study.

Conclusion: Exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study.

Conclusion: Exposure to cold air at age 6 was associated with subsequent asthma incidence in a population-based, longitudinal study.

Cold Air Challenge at Age 6 and Subsequent Incidence of Asthma

A Longitudinal Study

ENRICO LOMBARDI, WAYNE J. MORGAN, ANNE L. WRIGHT, RENATO T. STEIN, CATHARINE J. HOLBERG, and FERNANDO D. MARTINEZ

Respiratory Sciences Center, University of Arizona, Tucson, Arizona

The aim of this study was to assess the relation between bronchial hyperresponsiveness to dry, cold air at age 6 and the subsequent incidence of asthma. The cumulative incidence of newly diagnosed asthma between ages 6 and 11 among 360 children included in this study was 12.0%. Survival analysis showed that hyperresponsiveness to cold air at age 6 was associated with an increased risk of developing subsequent asthma (hazard ratio = 2.6, 95% CI = 1.2–5.4; $p = 0.01$). However, after adjusting for potential confounders, only mild wheezing at age 6 (adjusted hazard ratio = 7.5, 95% CI = 3.6–15.9; $p < 0.001$) and skin test reactivity to allergens at age 6 (adjusted hazard ratio = 3.6, 95% CI = 1.5–8.5; $p < 0.01$), but not hyperresponsiveness to cold air (adjusted hazard ratio = 0.9, 95% CI = 0.4–2.2; $p = 0.8$), remained significant predictors of subsequent development of asthma. These findings were substantially confirmed after stratifying for wheezing illnesses before age 3. We conclude that hyperresponsiveness to cold air at age 6 was associated with subsequent development of a diagnosis of asthma but this effect was not independent of atopy and mild wheezing at age 6. Lombardi E, Morgan WJ, Wright AL, Stein RT, Holberg CJ, Martinez FD. Cold air challenge at age 6 and subsequent incidence of asthma: a longitudinal study. *AM J RESPIR CRIT CARE MED* 1997;156:1863–1869.

Whether or not bronchial hyperresponsiveness (BHR) in children without a diagnosis of asthma is a risk factor for the development of asthma or asthma-like symptoms later in life is still a matter of debate. Although cross-sectional studies have demonstrated that BHR is associated with the presence of asthmatic symptoms in children (1–3), recent longitudinal studies (4–8) offered controversial answers to the question whether BHR can predict asthma. All these studies, however, were based on BHR tests that were performed in school-age children whose history of respiratory illness until the time of testing was either limited to the previous year (5, 7) or was obtained by retrospective questionnaires for the preschool years (4, 6, 8). It is thus not possible to exclude the possibility that respiratory symptoms compatible with a diagnosis of asthma could have been present in some of these children before they were tested for BHR.

Future strategies for the prevention of asthma will need to rely on the availability of markers that may allow for the identification of subjects at risk for the development of the disease. Understanding the potential role of BHR as a marker of a “pre-

asthmatic state” is important not only to shed light on the pathophysiology of asthma but could also have important clinical applications.

The purposes of this study were (1) to assess BHR at age 6 yr in a group of children who did not have a diagnosis of asthma and who did not have a history of respiratory symptoms compatible with such a diagnosis and (2) to study the relation between BHR and the incidence of new cases of asthma or asthma-like symptoms during the subsequent years. Respiratory symptoms and asthma diagnosis were evaluated prospectively from birth and were thus not subjected to preferential recall bias at the time of BHR testing.

METHODS

Study Design

This analysis was part of the Tucson Children's Respiratory Study, a longitudinal study of respiratory illness involving children enrolled at birth between May 1980 and October 1984 (9, 10). All subjects were patients of the pediatricians of a large local health maintenance organization. At the time of enrollment, parents completed a questionnaire about their own respiratory symptoms, education, and smoking habits. Parents were also asked to take their children to the pediatrician whenever they had signs and symptoms of lower respiratory tract illnesses (LRIs) such as deep or “wet” chest cough, wheezing, hoarseness, stridor, or shortness of breath. Pediatricians assessed such signs and symptoms directly.

Parents were asked to complete a questionnaire about their children's respiratory symptoms and again about their own smoking habits at the following children's mean \pm SD ages: 1.6 \pm 0.3 yr (age 2 survey), 2.9 \pm 0.5 yr (age 3 survey), and 6.0 \pm 0.6 yr (age 6 survey). During the latter survey, BHR to isocapnic hyperventilation with cold dry air (CA) was assessed in the children, and skin tests for prevalent

(Received in original form December 12, 1996 and in revised form June 30, 1997)

Supported by Grants HL-14136 and HL-56177 from the National Heart, Lung and Blood Institute.

Dr. Lombardi was a fellow from the III Pediatric Clinic, University of Florence, Florence, Italy.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Fernando D. Martinez, M.D., Respiratory Sciences Center, Arizona Health Sciences Center, 1501 North Campbell Ave., Tucson, AZ 85724.

Am J Respir Crit Care Med Vol 156, pp 1863–1869, 1997

aeroallergens in the Tucson area were also performed. For the purpose of this study, children who had ever been diagnosed as having asthma by a physician by the time of the age 6 survey were excluded from the analysis. Children who had more than three episodes of wheezing during the 12 mo prior to the age 2, age 3, and age 6 surveys and those who had evidence of severe asthma (that is, who had an emergency room visit for wheezing during the 12 mo prior to the CA challenge or who used asthma medications for more than 21 d during the 6 mo prior to the CA challenge) were also excluded regardless of a diagnosis of asthma. After these exclusions, a total of 368 subjects were available for analysis.

At a mean \pm SD age of 8.5 ± 0.7 yr (age 8 survey) and 10.8 ± 0.6 yr (age 11 survey), new information about the subjects' respiratory symptoms was collected by means of questionnaires completed by the parents. Eight subjects who performed CA challenge had no subsequent information available and were thus excluded. Since very few subjects had a follow-up longer than 6 yr, follow-up was truncated 6.0 yr after the CA challenge. The mean follow-up period after CA challenge was 4.4 ± 1.1 yr.

This study was approved by the Human Subjects Committee at the University of Arizona, and informed consent was obtained from the parents.

Definitions

Wheezing LRIs during the first 3 yr of life were assessed using the pediatrician's reports. Because some children changed pediatrician, not all subjects had information about wheezing LRIs during the first 3 yr of life despite their continued participation in the study, resulting in a smaller number of subjects for analyses when the data were stratified for wheezing LRIs (see RESULTS).

For the other respiratory signs and symptoms, questionnaires completed by parents were used. Parental history of asthma was defined as a history of asthma in either parent as reported in the enrollment questionnaire. Persistent cough was defined as at least two episodes of cough without a cold during the previous year. Wheezing was assessed by the question "Has this child's chest ever sounded wheezy or whistling?" Information about the number of episodes of wheezing during the previous year was obtained with the question "During the past year, how often has this child had wheezing or whistling?" The questions "Does this child cough during or shortly after vigorous exercise?" and "Does this child's chest sound wheezy or whistling during or shortly after vigorous exercise?" were used at age 6 to assess cough and wheezing after exercise, respectively. A child was considered to have developed asthma if he/she had, at the age 8 or age 11 survey, either: (1) asthma diagnosed by a physician with at least one episode of asthma or wheezing during the previous year or (2) more than three episodes of wheezing during the previous year regardless of a diagnosis of asthma.

Skin Tests

Skin prick tests were performed at the age 6 survey and included the following aeroallergens (Hollister-Stier Laboratories, Everett, WA): house-dust mix, Bermuda grass, careless weed, olive, mesquite, mulberry, and alternaria. Histamine and a negative control consisting of 50% glycerin were also applied. A child was considered to be atopic if he/she had a positive skin test reaction to at least one aeroallergen (> 3 mm after subtraction of the negative control value).

Cold Air Challenge

The mean \pm SD age at the time of the CA challenge was 6.1 ± 0.5 yr. Children who were wheezing or needed bronchodilators at the time of the CA challenge, or who had LRIs during the previous 6 wk or upper respiratory tract infections during the previous 3 wk, were temporarily excluded from the challenge and rescheduled for testing.

The equipment used for CA generation is described in detail elsewhere (11). Cold dry air (-15 to -25°C , $< 1\%$ relative humidity) was blown through a circuit connected to a mouthpiece by a Collins two-way J valve (Warren E. Collins, Inc., Braintree, MA). CO_2 was measured at the expiratory port with a CO_2 analyzer (Beckman, Fullerton, CA) and added into the circuit to keep the CO_2 concentration of the exhaled air and bias flow at 5%.

Lung function was assessed by asking the subjects to perform voluntary partial expiratory flow-volume curves. Tidal flow-volume curves were displayed on a computer monitor. At end-tidal inspiration, children were encouraged to exhale air forcefully, and the maximal expiratory flow at functional residual capacity (\dot{V}_{maxFRC} in milliliters per second) was recorded.

Baseline lung function was defined as the best \dot{V}_{maxFRC} among at least three acceptable prechallenge expirations. Subjects were then asked to breathe the CO_2 -enriched CA for 6 min. An arcade-video game, driven by two No. 2 Fleisch pneumotachs, was used to encourage the children to keep a minute ventilation of 18 to 20 L/min. The mean of the first two values within the first 5 min after the challenge was taken as postchallenge value. Percent fall in \dot{V}_{maxFRC} after CA challenge was calculated using the following equation:

$$\text{Percent fall} = \frac{\text{prechallenge} - \text{postchallenge}}{\text{prechallenge}} \times 100.$$

A subject was defined as having bronchial hyperresponsiveness to CA challenge (CABHR) if his/her percent fall in \dot{V}_{maxFRC} after CA was larger than the ninetieth percentile of the fall for the reference subjects (skin test-negative, never-wheezing, never asthma-diagnosed children as reported in the questionnaires at age 6). The cutoff value defined in this way corresponded to a percent fall of 41.1%.

Statistical Analysis

Unpaired Student *t* test and chi-squared test were used for the comparison of means and proportions. The 95% confidence intervals (95% CI) for relative risk (RR) were calculated with standard algorithms. Two-sided α levels < 0.05 were considered to be significant. To assess the incidence of asthma during the 6-yr follow-up, unadjusted Kaplan Meier failure curves were used, and comparisons of incidence rates were determined using the log-rank test (12). Hazard ratios (the likelihood in time of developing asthma for a child with a given risk factor divided by the likelihood in time of developing asthma for a child without that same risk factor) were calculated using the Cox proportional hazards model (12). Cox models were also used for multivariate analysis and were constructed by selecting variables found to be significantly associated with the dependent variable in the univariate analysis, or reported to be related to asthma in the literature (13). Variables considered as potential predictors of subsequent asthma were gender, CABHR, current mild wheezing (one to three episodes during the 12 mo prior to the age 6 questionnaire), skin test reactivity to allergens, maternal education (\leq or > 12 yr), current maternal smoking at age 6, and parental history of asthma. Because children were tested at different ages, the age at which the CA challenge was performed was included in the multivariate models.

RESULTS

A total of 1,024 children had questionnaires at the age 6 survey. Table 1 compares the 368 subjects who had not developed asthma by age 6 and who performed CA challenge to the rest of the population not included in this analysis ($n = 656$). Male gender, current maternal smoking, wheezing LRIs before age 3, persistent cough, atopy, and atopy and mild wheezing (one to three episodes of wheezing during the previous year) together were significantly lower in the study group than in the rest of the population. However, after stratifying for wheezing LRIs during the first 3 yr of life (Table 2), most of the differences between the study group and the rest of the population were still present only among children who had wheezing LRIs. Among children who did not have wheezing LRIs, subjects in the study group were not significantly different from the rest of the population, except for the lower proportion of children with both atopy and mild wheezing in the study group than in the rest of the population (8.5% versus 17.6%; $p < 0.01$). The groups did not differ in age at which CA challenge was performed. Children who had wheezing LRIs before age 3 had 3.2 times (95% CI = 2.4–4.3; $p < 0.001$) more asthma (as defined above) by age 6 than children who did not have wheezing LRIs.

TABLE 1
CHARACTERISTICS (ACTUAL NUMBERS IN PARENTHESES)
OF CHALLENGED AND NONCHALLENGED SUBJECTS
AT AGE 6 (n = 1,024)*

	With CA Challenge (n = 368)	Without CA Challenge (n = 656)
Males	43.8% (161/368)	51.1% [†] (335/656)
Maternal education > 12 yr	74.2% (273/368)	70.1% (459/655)
Current maternal smoking at age 6	14.4% (51/353)	20.8% [†] (130/624)
Parental history of asthma	22.3% (76/341)	24.8% (149/602)
Wheezing LRIs before age 3	25.4% (83/327)	38.9% [‡] (194/499)
Persistent cough [§]	20.2% (73/361)	30.3% (197/650)
Asthma by age 6 [¶]	—	27.3% (178/653)
Current wheeze at age 6, never asthma	18.8% (69/368)	14.3% (67/469)
Atopy	35.8% (129/360)	45.8% (183/400)
Current wheeze and atopy at age 6	8.9% (32/360)	22.1% [†] (87/394)
CABHR	14.1% (52/368)	—

* Totals for individual characteristics are not all the same because information is missing for some subjects.

[†] p < 0.05 by chi-squared test.

[‡] p < 0.001 by chi-squared test.

[§] Two or more episodes of cough without a cold during the previous year.

[¶] p = 0.005 by chi-squared test.

[¶] Asthma ever diagnosed by a physician or more than three episodes of wheezing during the previous year. Children who had asthma (as defined in METHODS) prior to or at the time of the age 6 survey were excluded from the study and did not undergo CA challenge.

Children who had mild wheezing at age 6 (one to three episodes of wheezing during the previous year) were more likely to be atopic and to cough or wheeze after exercise at age 6 than children who did not have mild wheezing (atopy: 47.1% [32 of 68] versus 33.2% [97 of 292], p < 0.05; cough after exercise: 32.4% [22 of 68] versus 13.0% [39 of 299], p < 0.001; wheezing after exercise: 14.5% [10 of 69] versus 1.7% [5 of 299], p < 0.001).

At age 6, children who were CABHR positive were more likely to have mild wheezing, atopy, and atopy and mild wheezing together than children who were CABHR negative (mild

wheezing: 38.5% [20 of 52] versus 15.5% [49 of 316], p < 0.001; atopy: 59.6% [31 of 52] versus 31.8% [98 of 308], p < 0.001; atopy and mild wheezing together: 26.9% [14 of 52] versus 5.8% [18 of 308], p < 0.001). In Table 3, the proportions of CABHR-positive children among subjects with potential risk factors for BHR are compared with those without risk factors. Only mild wheezing (RR = 2.7, 95% CI = 1.7–4.4), atopy (RR = 2.6, 95% CI = 1.6–4.4), and wheezing and atopy together (RR = 3.8, 95% CI = 2.3–6.2) were significantly associated with CABHR among children who had not developed asthma by age 6.

Of the 360 children who performed CA challenge and who had information about respiratory symptoms after age 6, 35 developed asthma (as defined above) by age 11; 30 were given a diagnosis of asthma by a physician and five developed recurrent wheezing (more than three episodes during the year prior to the questionnaire) without a physician diagnosis of asthma. The cumulative incidence of asthma between ages 6 and 11 (as assessed by Kaplan Meier failure curves) was 12.0%. Children who were CABHR positive at age 6 were more likely to develop new asthma between ages 6 and 11 than children who were CABHR negative (hazard ratio = 2.6, 95% CI = 1.2–5.4; p = 0.01) (Figure 1). Male gender (hazard ratio = 2.3, 95% CI = 1.2–4.5; p = 0.02), current mild wheezing (one to three episodes during the previous 12 mo) at age 6 (hazard ratio = 7.5, 95% CI = 3.8–14.7; p < 0.001), and atopy at age 6 (hazard ratio = 3.7, 95% CI = 1.8–7.4; p < 0.001) were also significantly associated with onset of asthma in the univariate analysis. Children with parental history of asthma were almost twice as likely to develop asthma after age 6 (hazard ratio = 1.9, 95% CI = 0.9–4.0; p = 0.07) when compared with children with no such history. Age at the time of CA challenge, maternal education, and maternal smoking at age 6 were not significantly associated with subsequent asthma (data not shown).

Multivariate analysis showed that, after adjusting for current mild wheezing at age 6, skin test reactivity to allergens at age 6, and other covariates, only mild wheezing and skin test reactivity to allergens were significant and independent predictors of subsequent onset of asthma, whereas CABHR was no longer significantly associated with new cases of asthma after

TABLE 2
CHARACTERISTICS (ABSOLUTE NUMBERS IN PARENTHESES) OF CHALLENGED AND
NONCHALLENGED SUBJECTS AT AGE 6 AFTER STRATIFYING FOR THE PRESENCE
OF WHEEZING LRIs DURING THE FIRST 3 yr OF LIFE (n = 826)*

	No Wheezing LRIs		Wheezing LRIs	
	With CA Challenge (n = 244)	Without CA Challenge (n = 305)	With CA Challenge (n = 83)	Without CA Challenge (n = 194)
Males	45.5% (111/244)	49.8% (152/305)	41.0% (34/83)	55.2% [†] (107/194)
Maternal education > 12 yr	71.7% (175/244)	73.7% (224/304)	78.3% (65/83)	68.6% (133/194)
Current maternal smoking at age 6	15.0% (35/233)	14.7% (43/292)	12.2% (10/82)	25.1% [†] (47/187)
Parental history of asthma	21.1% (48/228)	20.5% (58/283)	27.0% (20/74)	32.6% (58/178)
Persistent cough [§]	21.2% (51/241)	26.6% (81/304)	24.1% (20/83)	40.2% (76/189)
Asthma by age 6	—	18.8% (57/304)	—	47.4% (91/192)
Current wheeze at age 6, never asthma	16.8% (41/244)	12.2% (30/245)	28.9% (24/83)	22.4% (22/98)
Atopy	36.9% (87/236)	43.4% (82/189)	39.8% (33/83)	49.7% (71/143)
Current wheeze and atopy at age 6	8.5% (20/236)	17.6% (33/188)	13.3% (11/83)	28.6% (40/140)
CABHR	13.9% (34/244)	—	14.5% (12/83)	—

* Totals for individual characteristics are not all the same because information is missing for some subjects.

[†] p < 0.05 by chi-squared test.

[§] Two or more episodes of cough without a cold during the previous year.

[¶] Asthma ever diagnosed by a physician or more than three episodes of wheezing during the previous year. Children who had asthma (as defined in METHODS) prior to or at the time of the age 6 survey were excluded from the study and did not undergo CA challenge.
p < 0.01 by chi-squared test.

TABLE 3
PROPORTIONS OF SUBJECTS WITH CABHR BY POTENTIAL DETERMINANTS OF BRONCHIAL RESPONSIVENESS AT AGE 6*

Risk Factor	CABHR among Subjects	
	With Risk Factor	Without Risk Factor
Male gender	14.9% (24/161)	13.5% (28/207)
Maternal education > 12 yr	14.3% (39/273)	13.7% (13/95)
Current maternal smoking at age 6	5.9% (3/51)	15.2% (46/302)
Parental history of asthma	15.8% (12/76)	13.2% (35/265)
Wheezing LRIs before age 3	14.5% (12/83)	13.9% (34/244)
Persistent cough [†] at age 6	17.8% (13/73)	13.2% (38/288)
Current wheeze at age 6, never asthma [‡]	29.0% (20/69)	10.7% [§] (32/299)
Atopy at age 6	24.0% (31/129)	9.1% [§] (21/231)
Current wheeze and atopy at age 6 [‡]	43.8% (14/32)	11.6% [§] (38/328)

* Totals are not all the same because information is missing for some subjects. Children who had asthma (as defined in METHODS) prior to or at the time of the age 6 survey were excluded from the study and did not undergo CA challenge.

[†] Two or more episodes of cough without a cold during the previous year.

[‡] One to three episodes of wheezing during the previous year.

[§] $p < 0.001$ by chi-squared test.

[‡] Includes all subjects who did not have mild wheezing and atopy at age 6.

age 6 (Table 4). In fact, subjects without atopy or current wheezing at age 6 who were CABHR positive at that age were no more likely to develop subsequent asthma than nonwheezing nonatopic subjects who were CABHR negative (1 of 15 [6.7%] versus 7 of 176 [4.0%]; $p = 0.6$). No association was found between wheezing LRIs before age 3 and asthma by age 11 among nonasthmatic nonwheezing nonatopic children at age 6.

Having a wheezing LRI during the first 3 yr of life was not a significant predictor of the development of new cases of asthma after age 6 either univariately or after adjusting for CABHR (adjusted hazard ratio = 1.4, 95% CI = 0.7–3.0; $p = 0.35$). After stratifying by history of wheezing LRIs during the first 3 yr of life, CABHR was a strong predictor of asthma only among children who did not have wheezing LRIs (hazard ratio = 3.8, 95% CI = 1.6–9.2; $p = 0.001$) (Figure 2, upper panel). Among children who had wheezing LRIs during the first 3 yr of life, CABHR was not significantly associated with a higher incidence of asthma between ages 6 and 11 (hazard ratio = 1.6, 95% CI = 0.3–7.5; $p = 0.6$) (Figure 2, lower panel).

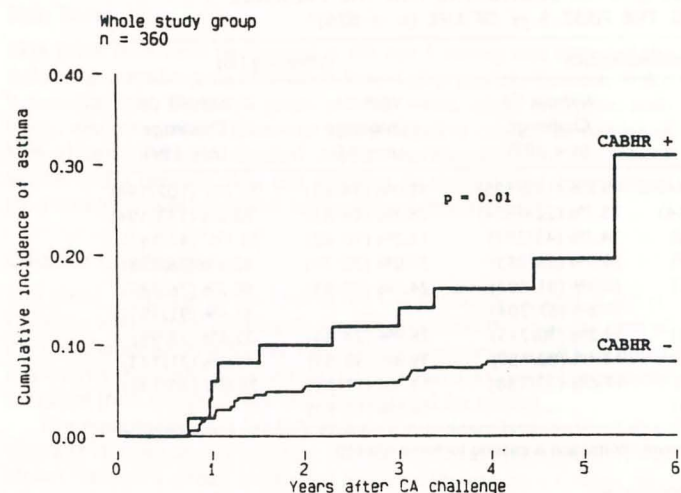


Figure 1. Cumulative incidence of asthma after stratifying for CABHR in the whole study group ($n = 360$).

TABLE 4
COX PROPORTIONAL HAZARDS MODEL FOR DEVELOPING NEW ASTHMA BETWEEN AGES 6 AND 11 IN THE WHOLE STUDY GROUP ($n = 313$)

	Adjusted Hazard Ratio (95% CI)	p Value
Male gender	1.5 (0.7–3.3)	0.261
Age*	1.6 (0.8–3.0)	0.164
CABHR	0.9 (0.36–2.2)	0.809
Mild wheezing [†]	7.5 (3.6–15.9)	< 0.001
Atopy	3.6 (1.5–8.5)	0.003
Maternal education > 12 yr	2.1 (0.8–5.2)	0.118
Current maternal smoking at age 6	1.4 (0.5–4.3)	0.557
Parental history of asthma	1.2 (0.6–2.7)	0.594

* Age at which CA challenge was performed.

[†] One to three episodes of wheezing during the 12 mo prior to the age 6 survey.

Multivariate analysis confirmed that, in children who did not have wheezing LRIs before age 3, only atopy and mild wheezing at age 6 were significantly associated with the development of new asthma after adjusting for potential confound-

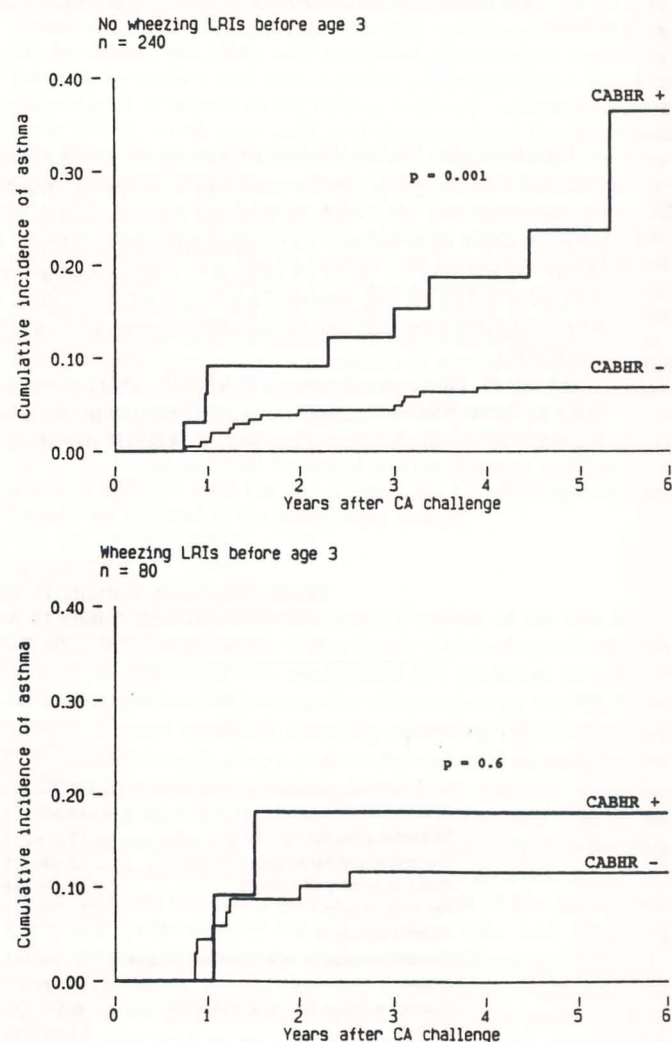


Figure 2. (Upper panel) Cumulative incidence of asthma after stratifying for CABHR among children who did not have wheezing LRIs before age 3 ($n = 240$). (Lower panel) Cumulative incidence of asthma after stratifying for CABHR among children who had wheezing LRIs before age 3 ($n = 80$).

TABLE 5
COX PROPORTIONAL HAZARDS MODEL FOR DEVELOPING
NEW ASTHMA BETWEEN AGES 6 AND 11 IN CHILDREN
WHO DID NOT HAVE WHEEZING LRIs DURING THE
FIRST 3 yr OF LIFE (n = 208)

	Adjusted Hazard Ratio (95% CI)	p Value
Male gender	1.7 (0.7-4.4)	0.279
Age*	2.2 (0.9-5.3)	0.072
CABHR	2.2 (0.8-6.2)	0.121
Mild wheezing†	12.8 (5.0-32.9)	< 0.001
Atopy	3.1 (1.0-9.6)	0.046
Maternal education > 12 yr	1.2 (0.5-3.3)	0.666
Current maternal smoking at age 6	1.3 (0.3-5.2)	0.749
Parental history of asthma	1.3 (0.5-3.3)	0.575

* Age at which CA challenge was performed.

† One to three episodes of wheezing during the 12 mo prior to the age 6 survey.

ers (Table 5). Children who were CABHR positive were 2.2 times more likely to develop asthma than CABHR-negative children after adjusting for the other covariates, but this association did not reach statistical significance (95% CI = 0.8-6.2; $p = 0.121$). In children who had wheezing LRIs before age 3, atopy and mild wheezing at age 6 were also the only two significant predictors of new cases of asthma after age 6 (atopy: adjusted hazard ratio = 18.0, 95% CI = 1.1-300.0, $p = 0.04$; mild wheezing: adjusted hazard ratio = 11.7, 95% CI = 1.9-72.1, $p < 0.01$) after adjusting for the same covariates shown in Table 5. No interaction between the different risk factors was found to be significant either among children who did not have wheezing LRIs before age 3 or among those who had wheezing LRIs before age 3.

DISCUSSION

We found that CABHR assessed at a mean age of 6 yr was a significant predictor of subsequent diagnosis of asthma and/or severe asthma-like symptoms in children who did not have a diagnosis of asthma at the time of the CA challenge. However, after adjusting for potential confounders, this effect was no longer significant, and atopy and current mild wheezing (one to three episodes) at age 6 were the only significant and independent predictors of subsequent asthma. In children who did not have wheezing LRIs before age 3, CABHR was associated with a 2.2-fold risk of developing new asthma after adjusting for the other covariates, but this association did not reach statistical significance.

Many of the studies on BHR and subsequent development of asthma in children have been performed using either methacholine challenge or histamine challenge. Although it has been pointed out that in adults suspected of having asthma a positive methacholine challenge not always corresponds to a positive CA challenge and vice versa (14), most of the studies in the literature show a strong correlation between the response to CA and the response to either histamine (15) or methacholine (15-18). It has been suggested that CABHR may be more specific for asthma than methacholine BHR (19).

Several studies have suggested that BHR can predict the development of new asthma in children. Hopp and coworkers (4) studied 13 subjects before and after the onset of clinical asthma: the mean age at initial visit was 10.6 yr and the mean follow-up interval was 6.3 yr. They found that 10 of the 13 subjects had moderate to marked bronchial hyperreactivity at the initial visit as assessed by methacholine challenge. This was significantly different from the response to methacholine of 13

subjects from nonasthmatic families who did asthma but not significantly different from the methacholine of 13 subjects from asthmatic families who did not develop asthma. However, five of the 13 subjects had wheezing at the initial visit and the number studied was very small. Peat and colleagues (5) followed subjects 8 to 11 yr of age over a period of 1 yr. BHR was assessed by means of methacholine challenge and in about respiratory symptoms was collected using questionnaires completed by parents. At the beginning of the study subjects were categorized into four groups: "current asthma" (wheeze), "wheeze only," "BHR only," and "normal." At the end of the study, the "BHR only" group had a prevalence of wheeze of 52% versus 18% in the "normal" group ($p < 0.001$). However, atopy was significantly higher in the "BHR only" group than in the control group, and no adjustment for atopy was made. Jones (7) studied 55 asymptomatic BHR-positive children compared with 55 asymptomatic BHR-negative control subjects (age range: 5 to 11 yr). BHR was assessed by means of free running exercise test. At the follow-up 6 yr later, 52% of the subjects in the BHR group had developed asthma versus 13% of the subjects in the control group ($p < 0.001$). However, again, however, the BHR group was not truly asymptomatic at the beginning of the study, since prevalence of cough, wheezing, and bronchitis was significantly higher in this group than in the control group. No adjustment was made for skin test activity to allergens. Carey and associates (8), who studied adolescents over a period of 18 mo, found that BHR, assessed by means of CA or methacholine challenge, was significantly and independently associated with a greater likelihood of developing wheezing by the end of the study. Only subjects who were not prevalent wheeze at the time of testing were excluded from the analyses. Conversely, de Gooijer and coworkers (6) reported that only atopy (but not BHR as assessed by histamine challenge at ages 8 to 11 yr) was a significant predictor of onset of asthma-like symptoms in young adulthood. It is important to point out that, in all these studies, information about the years prior to the investigation was either collected retrospectively, which could have introduced preferential recall bias, or limited to the previous 12 mo, thereby failing to account for earlier symptoms or diagnoses.

In several of the previous reports, no adjustment was made for mild asthma-like symptoms at the time of BHR testing. In our study, mild wheezing (one to three episodes) at age 6 was the strongest risk factor for developing a diagnosis of asthma or asthma-like symptoms between ages 6 and 11. It is possible that, in children with BHR, infrequent wheezing may already represent a mild form of asthma (5, 20). A recent report suggests that BHR in asthmatic children is associated with evidence of airway inflammation (21). The underlying pathophysiology of BHR in asymptomatic children, however, remains to be elucidated. In asymptomatic subjects, BHR might represent a manifestation of subclinical inflammation of the airways (22). Peat and coworkers (19), however, found that asymptomatic BHR-positive children had eosinophil counts in the sputum that were not significantly different from those in normal control subjects and were lower than those in asthmatic BHR-positive children. In addition, BHR in asymptomatic subjects did not improve after treatment with inhaled budesonide. These findings suggest that symptomatic and asymptomatic BHR-positive children may have different inflammatory patterns in the airways.

Atopy was also a strong predictor of onset of asthma between ages 6 and 11. This finding is in agreement with the above-mentioned study by de Gooijer and coworkers (6) and

is also consistent with the data by Sears and colleagues (23), who found a strong positive association between the prevalence of BHR and the level of total serum IgE as a measure of atopy in 11-yr-old children. Recently, this same group (24) reported that there is also a close association between BHR and the size of the reaction to a panel of allergy skin tests both in asthmatic and nonasthmatic subjects. Moreover, twin studies (25, 26) suggest that BHR may be mainly an acquired phenomenon secondary to atopy. In addition, Postma and associates (27) found a strong association between BHR and atopy and suggested that BHR may be co-inherited with an elevated level of serum total IgE.

We found that BHR assessed at a mean age of 6 by CA challenge was a significant univariate predictor of new asthma by age 11 among children who did not have wheezing LRIs during the first 3 yr of life and who did not have asthma at age 6. We did not find such an association among children who had wheezing LRIs before age 3. The most likely explanation for this discrepancy is that children who wheeze during the first 3 yr of life tend to develop a diagnosis of asthma by age 6 more often than those who do not wheeze during the first 3 yr of life (28). Because we excluded from the analysis all subjects with asthma and/or severe or frequent wheezing by age 6, most children from the wheezing LRI group who were potentially CABHR positive were probably excluded from this analysis because they had already developed asthma or severe wheezing before age 6.

It has been suggested that bronchiolitis could cause subsequent BHR (29) and that BHR in asymptomatic children may be due to previous insults (19), such as wheezing LRIs during the first years of life. In our data, there was no association between wheezing LRIs before age 3 and CABHR at age 6. However, among CABHR-negative children, the cumulative incidence of asthma was higher (albeit not significantly) in children who had a history of wheezing LRIs than in those who did not have a history of wheezing LRIs (11.6% versus 6.8%, $p = 0.178$). We thus cannot exclude the possibility that wheezing LRIs during the first 3 yr of life may be associated with the development of asthma after age 6 independently of BHR.

In children who did not have wheezing LRIs before age 3, CABHR was associated with a 2.2-fold increased risk of developing new asthma after adjusting for the other covariates, but this association did not reach statistical significance. A possible explanation for this finding is that, in children who did not have wheezing LRIs, CABHR at age 6 might actually be an independent predictor of subsequent asthma, but this effect may perhaps not be strong enough to be statistically significant in our data set after adjusting for mild wheezing at age 6, skin test reactivity to allergens, and other covariates. A genome-wide search for BHR-linked loci by Daniels and colleagues (30) found that only one out of three loci showing evidence of linkage to BHR did not co-segregate with markers for atopy. In other words, BHR might be mostly co-inherited with atopy (27), but in some cases (perhaps a minority) BHR might be independent of atopy. It has also been suggested that the association between BHR and atopy might simply be the result of the high prevalence in the population of two independently heritable traits (31). A preliminary report by Gibson and associates (32) also suggests that BHR, as assessed by histamine challenge at the age of 1 mo, predicts asthma, atopy, and level of BHR at the age of 6 yr, implying that the level of BHR may already be partially set from birth. Clearly, the relationship between BHR, atopy, and respiratory symptoms is still not completely understood (33). More studies on the genetics and ontogeny of BHR and of the immune response sys-

tem of the lung will certainly contribute to elucidate this complex issue.

Finally, it needs to be noted that, given the high variability of BHR measurements in time, a single BHR test may not give reliable information about the usual responsiveness of the airways and the tendency to subsequently develop respiratory symptoms. A recent report by Burrows and coworkers (34) shows that repeated positive methacholine tests between age 9 and age 15 predicts almost 85% of current wheezing at age 15.

In summary, CABHR measured as early as at a mean age of 6 yr was a significant univariate predictor of asthma and/or asthma-like symptoms in children who did not have a diagnosis of asthma by age 6. However, after adjusting for other covariates, this association was no longer statistically significant, and atopy and current mild wheezing at age 6 were the only significant and independent predictors of subsequent asthma.

Acknowledgment: The writers are indebted to Marilyn Smith, R.N., and Lydia De La Ossa, R.N., the study nurses, and to Shelley Radford and Bruce Saul for technical assistance.

References

1. Lee, D. A., N. R. Winslow, A. N. P. Speight, and E. N. Hey. 1983. Prevalence and spectrum of asthma in childhood. *B.M.J.* 286:1256-1258.
2. Salome, C. M., J. K. Peat, W. J. Britton, and A. J. Woolcock. 1987. Bronchial hyperresponsiveness in two populations of Australian schoolchildren: I. Relation to respiratory symptoms and diagnosed asthma. *Clin. Allergy* 17:271-281.
3. Sears, M. R., D. T. Jones, M. D. Holdaway, C. J. Hewitt, E. M. Flannery, G. P. Herbison, and P. A. Silva. 1986. Prevalence of bronchial reactivity to inhaled methacholine in New Zealand children. *Thorax* 41:283-289.
4. Hopp, R. J., R. G. Townley, R. E. Biven, A. K. Bewtra, and N. M. Nair. 1990. The presence of airway reactivity before the development of asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:2-8.
5. Peat, J. K., B. G. Toelle, C. M. Salome, and A. J. Woolcock. 1993. Predictive nature of bronchial responsiveness and respiratory symptoms in a one year cohort study of Sydney schoolchildren. *Eur. Respir. J.* 6:662-669.
6. De Gooijer, A., P. L. P. Brand, J. Gerritsen, G. H. Koeter, D. S. Postma, and K. Knol. 1993. Changes in respiratory symptoms and airway hyperresponsiveness after 27 years in a population-based sample of school children. *Eur. Respir. J.* 6:848-854.
7. Jones, A. 1994. Asymptomatic bronchial hyperreactivity and the development of asthma and other respiratory tract illnesses in children. *Thorax* 49:757-761.
8. Carey, V. J., S. T. Weiss, I. B. Tager, S. R. Leeder, and F. E. Speizer. 1996. Airways responsiveness, wheeze onset, and recurrent asthma episodes in young adolescents. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153:356-361.
9. Taussig, L. M., A. L. Wright, W. J. Morgan, H. R. Harrison, and the Group Health Associates' Personnel. 1989. 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.* 129:1219-1231.
10. Wright, A. L., L. M. Taussig, C. G. Ray, W. J. Morgan, and GHMA Pediatricians. 1989. The Tucson Children's Respiratory Study (II): lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am. J. Epidemiol.* 129:1232-1246.
11. Geller, D. E., W. J. Morgan, K. A. Cota, A. L. Wright, and L. M. Taussig. 1988. Airway responsiveness to cold, dry air in normal infants. *Pediatr. Pulmonol.* 4:90-97.
12. Cox, D. R., and D. Oakes. 1984. *Analysis of Survival Data*. 1st ed. Chapman and Hall, London.
13. Rothman, K. J. 1986. *Modern Epidemiology*, 1st ed. Little Brown, Boston. 285-310.
14. Filuk, R. B., C. Serrette, and N. R. Anthonisen. 1989. Comparison of methacholine and cold air in patients suspected of having asthma. *Chest* 95:948-952.
15. Aquilina, A. T. 1983. Comparison of airway reactivity induced by histamine, methacholine, and isocapnic hyperventilation in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 38:766-770.
16. O'Byrne, P. M., G. Ryan, M. Morris, D. McCormack, N. L. Jones.

- J. L. C. Morse, and F. E. Hargreave. 1982. Asthma induced by cold air and its relation to nonspecific bronchial responsiveness to methacholine. *Am. Rev. Respir. Dis.* 125:281-285.
17. Weiss, J. W., T. H. Rossing, E. R. McFadden, Jr., and R. H. Ingram, Jr. 1983. Relationship between bronchial responsiveness to hyperventilation with cold and methacholine in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 72:140-144.
 18. Tessier, P., H. Ghezzi, J. L'Archevêque, A. Cartier, and J. L. Malo. 1987. Shape of the dose-response curve to cold air inhalation in normal and asthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:1418-1423.
 19. Pin, I., S. Radford, R. Kolendowicz, B. Jennings, J. A. Denburg, F. E. Hargreave, and J. Dolovich. 1993. Airway inflammation in symptomatic and asymptomatic children with methacholine hyperresponsiveness. *Eur. Respir. J.* 6:1249-1256.
 20. Mortagy, A. K., J. B. L. Howell, and W. E. Waters. 1986. Respiratory symptoms and bronchial reactivity: identification of a syndrome and its relation to asthma. *B.M.J.* 293:525-529.
 21. Ferguson, A. C., M. Whitelaw, and H. Brown. 1992. Correlation of bronchial eosinophil and mast cell activation with bronchial hyperresponsiveness in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90:606-613.
 22. Sanford, A., T. Weir, and P. Paré. 1996. The genetics of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153:1749-1765.
 23. Sears, M. R., B. Burrows, E. M. Flannery, G. P. Herbison, C. J. Hewitt, and M. D. Holdaway. 1991. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N. Engl. J. Med.* 325:1067-1071.
 24. Burrows, B., M. R. Sears, E. M. Flannery, G. P. Herbison, and M. D. Holdaway. 1995. Relations of bronchial responsiveness to allergy skin test reactivity, lung function, respiratory symptoms, and diagnoses in thirteen-year-old New Zealand children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:548-556.
 25. Svartengren, M., C. H. Ericsson, B. Mossberg, and P. Camner. 1990. Bronchial reactivity and atopy in asthma discordant monozygotic twins. *Ann. Allergy* 64:124-128.
 26. Ericsson, C. H., M. Svartengren, B. Mossberg, N. Pedersen, and P. Camner. 1991. Bronchial reactivity and allergy-promoting factors in monozygotic twins discordant for allergic rhinitis. *Ann. Allergy* 67:53-59.
 27. Postma, D. S., E. R. Bleecker, P. J. Amelung, K. J. Holroyd, J. Xu, C. I. M. Panhuysen, D. A. Meyers, and R. C. Levitt. 1995. Genetic susceptibility to asthma—bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N. Engl. J. Med.* 333:894-900.
 28. Martinez, F. D., A. L. Wright, L. M. Taussig, C. J. Holberg, M. Halonen, W. J. Morgan, and the Group Health Medical Associates. 1995. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N. Engl. J. Med.* 332:133-138.
 29. Samet, J. M., I. B. Tager, and F. E. Speizer. 1983. The relationship between respiratory illness in childhood and chronic air-flow obstruction in adulthood. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:508-523.
 30. Daniels, S. E., S. Bhattacharya, A. James, N. I. Leaves, A. Young, M. R. Hill, J. A. Faux, G. F. Ryan, P. N. Le Souëf, G. M. Lathrop, A. W. Musk, and W. O. C. M. Cookson. 1996. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 383:247-250.
 31. Weiss, S. T., D. Sparrow, and G. T. O'Connor. 1993. The interrelationship among allergy, airways responsiveness, and asthma. *J. Asthma* 30:329-343.
 32. Gibson, N. A., L. Palmer, S. Young, D. Diepeveen, P. Rye, P. Burton, L. I. Landau, and P. N. Le Souëf. 1995. Association between airway responsiveness (AR) at 1 month of age, and AR and development of asthma/atopy at 6 years of age (abstract). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:A468.
 33. Brand, P. L. P. 1994. Airway inflammation in symptomatic and asymptomatic children with methacholine hyperresponsiveness (letter). *Eur. Respir. J.* 7:829.
 34. Burrows, B., M. R. Sears, E. M. Flannery, G. P. Herbison, M. D. Holdaway, and P. A. Silva. 1995. Relation of the course of bronchial responsiveness from age 9 to age 15 to allergy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:1302-1308.

ANEXO 4

[The following text is extremely faint and illegible due to low contrast and blurring. It appears to be a list of items or a table of contents.]

On Early Sensitization to Allergens
and Development of Respiratory Symptoms

Duane Sherrill, Ph.D.
Renato Stein, M.D. /
Fernando Martinez, M.D.

Respiratory Sciences Center
University of Arizona, College of Medicine
Tucson, Arizona 85724

Running Title: Early Sensitization and Respiratory Symptoms

Corresponding Author:

Duane Sherrill, Ph.D.
University of Arizona, College of Medicine
Respiratory Sciences Center
1501 N. Campbell
Tucson AZ, 85724
Phone :(520) 626-7513 FAX: 626-6970

ABSTRACT

Background:

It has been suggested that subjects who become sensitized to allergens at younger ages are more likely to develop asthma and asthma like symptoms than those who become sensitized at an older age.

Objective and Methods:

In this study we examine this issue in children enrolled in the Tucson Epidemiology Study of Obstructive Airways Disease who had at least one skin test performed before and after 8 years of age. Data were available through the twelfth survey, spanning a period of up to 20 years. During the first, sixth, seventh and eleventh surveys skin testing with commercial available allergens were done.

Questions concerning respiratory symptoms were asked at each survey.

Conclusion:

Children who were sensitized to any allergen before age 8 were significantly more likely to have any shortness of breath with wheeze (SOBWZ), wheeze apart from colds and wheeze most days, after age 8 years, than children who were sensitized after that age (OR=4.1 SOBZ, OR=3.88 WZ apart from colds, and OR=2.83 WZ most days). Children who were sensitized after 8 were not more likely to have the symptoms described above than children who were never found to be sensitized. Based on these results we conclude that early allergy sensitization is a significant risk factor for later development of wheezy symptoms, where as late sensitization is not.

Key Words: epidemiology, skin test, asthma, children

INTRODUCTION

There has been an increasing trend in asthma prevalence, morbidity and mortality over the last two decades. Currently an estimated 4.8 million children (ages<17) suffer from asthma [1]. This increased prevalence of asthma has resulted in an estimated 1.4 million visits to the emergency rooms and approximately 5,000 deaths [2]. Asthma is often considered a stratified disease, which has different symptoms at different ages and different clinical expressions at each age. The course of disease in children involves alterations in development of the immune and respiratory systems, with the level of involvement being determined by the complex interaction between genetic predisposition and environmental factors. An important determinant of asthma appears to be the timing of the environmental exposures [3].

The notion that asthma is a "developmental disease", is also supported by the significant association of the prevalence of asthma with immunological responses to exposures. Studies in children have demonstrated that early sensitization to aeroallergens is more strongly related with later development of asthma-like symptoms than sensitization later in life [4]. Others have shown that exposure to indoor allergens, like house dust mite, is positively associated with bronchial hyper-responsiveness (BHR) during the first year of life [5] and that there is a strong correlation between BHR after birth and that measured at age 6 [6]. It is also felt that viral respiratory infections early in life will affect the course of asthma, depending on the level of immune development [7].

How the respiratory system develops may depend on the timing of specific exposures. For example, early exposures to viral infections and/or passive smoke may affect maturation of the lungs and airways [8,9], thus potentially influencing development of asthma. Likewise, the type of feeding during early life, for example breast feeding, also appears to play an important role in lung development and subsequently the development of asthma or asthma like symptoms [10]. In addition, lung function growth appears to be slower among children with BHR [11,12], indicating that the two factors are interrelated. These results suggest that, among susceptible children, a sequence of events

occurring at different ages may affect their immune and airways systems, yet only certain pathways will eventually lead to asthma. The age at which exposure is thought to be most critical is uncertain, however exposures in utero and in early postnatal life have even been suggested as potential risk factors for later developing asthma [13,14].

In this study we compared the prevalence of wheezing respiratory symptoms between children who became sensitized to aeroallergens before age 8 years, those who became sensitized after age 8 years, and those who never became sensitized. The hypothesis being tested was that children who were sensitized early (<8 yrs) would develop more wheezing symptoms than those who became sensitized later in life (> 8 yrs).

METHODS

Study Population:

Subjects were white non-Mexican American participants in the Tucson Epidemiological Study of Airways Obstructive Disease. Detailed description of the study design and methods of data collection have been reported previously [15]. Briefly, the population in this ongoing study is a random stratified cluster in Tucson, Arizona containing 3805 individuals in 1655 households enrolled in 1972-1973, with new enrollees added by marriage and births. Subjects were included in this study if they had at least two skin prick tests, with one before and one after age 8 years.

Allergen Skin Testing:

Data were available for this analysis through the twelfth survey, spanning a period of up to 20 years. During the first, sixth, seventh and eleventh surveys skin testing with commercially available allergens were done. Since not all subjects were seen at each survey, surveys 8-10 and 12 were considered catch up surveys where subjects who came in that had not been tested previously were tested at that time. The current report includes both the surveys where the testing was scheduled and those considered catch up.

During selected surveys allergen prick tests were performed by trained nurses according to the method of Pepys [16]. Details of the skin test procedure have been previously reported [17,18]. The same five antigen mixtures (Hollister-Stier Laboratories, Spokane, Wash.) were applied in the same concentrations each survey: house dust (1:10), Dermaticeae mold mix (1:100), Bermuda grass (1:20), tree mix (1:20), and weed mix (1:20). A control solution of 50% glycerol was also included. In survey 11, nine additional antigen mixes were added, but these additional allergens were not considered in the current study. Wheal size was calculated as the sum of the two major axis or diameters. Subjects were considered skin test positive at any survey where they responded to any allergen with a wheal size of greater than 2 mm after subtracting the wheal size of the control test.

Subjects who satisfied the inclusion criteria of having at least one skin test before and after a cut off age of 8 years were divided into four independent categories. If all skin tests prior and after the cut off age were negative, these subjects were classified as "non-sensitized", likewise, if the pre-cutoff test(s) was negative and the post test(s) was positive, these subjects were considered "late sensitized". The other two groups were positive-negative or "remission" and positive-positive or "early sensitized", using the same schema. Since there was only one subject in the "remission" subgroup, this subject was excluded from subsequent analysis.

Immunoglobulin E:

During the first, sixth, and eleventh surveys venous blood was collected for total serum IgE determinations. All serum IgE levels were measured in the same laboratory by the PRIST technique [19]. Samples were run in duplicate, as was an aliquot of a reference serum in each batch. In this analysis we used the average of the two IgE determinations.

Respiratory Symptoms:

Self administered questionnaires were completed at each survey by the subjects' parents if the child was less than age 15 years of age, and by the participants thereafter. Subjects who had a positive response to the question "Does his or her chest ever sound wheezy or whistling?" were asked to distinguish if it occurred only with colds or apart from colds and if it occurred most days. For the current study we considered two wheeze categories, any wheezing apart from colds and wheezing most days, with the latter being considered the more severe group. Subjects were classified into a wheezing category if they answered positively to the above question at any survey after the age of eight years. Questions regarding attacks of shortness of breath with wheezing (SOBWZ) included a linear scale from 1-5, with 1 indicating "rarely" and five indicating "very often". Three categories of SOBWZ were considered. One was those subjects reporting SOBWZ only "rarely", the second was those reporting a value of 2 or 3 (occasional) and the third was "any", which included subjects with any positive response. As with the wheeze categories, we were only interested in those subjects who reported

shortness of breath and wheeze after the cutoff age of 8 years. If a subject reported having a symptom at different levels of severity in different surveys he/she was classified into the more severe category. Because of the high prevalence of rhinitis in the region [20], subjects were classified as having persistent rhinitis if they had a positive response to the question "Has he or she had hay fever or any allergy that makes the nose runny or stuffy, apart from colds?", at two or more surveys after 8 years of age.

Statistical Methods

Statistical comparisons were made using Chi-square tests, analysis of variance and students unpaired "t" test. Mean wheal sizes between early and late sensitized subjects over time were compared using longitudinal methods for unbalanced repeated measures, utilizing random effect models [21]. All statistical comparisons were made at the $\alpha=0.05$ significance level.

RESULTS

There were 133 subjects who met the inclusion criteria of having at least one skin test before and after the age of 8 years. The average age of their initial skin test was 5.74 ± 1.45 years. Fifty nine percent of those included were males.

The proportions of children who developed wheezing symptoms or hay fever, stratified by allergic sensitization, are illustrated in Figures 1-3. A significantly ($p < 0.001$) larger proportion of children who became sensitized before the age of 8 years reported having SOBWZ than those who became sensitized after age 8 years (Figure 1). There were no significant differences in prevalence of SOBWZ between late sensitized and non-sensitized children. A similar trend was also observed for children reporting wheeze most days and wheeze apart from colds (Figure 2). These findings were only statistically significant for wheeze apart from cold ($p < 0.001$). In contrast, the results for persistent rhinitis (Figure 3) showed no difference between those who became sensitized, early or late. Furthermore, any sensitization lead to increased prevalence of rhinitis when compared to non-sensitized children.

Since there were no significant differences in the proportions of non-sensitized and late sensitized children reporting wheeze and SOBWZ, these two groups were combined for estimating the odds ratios associated with early sensitization (Table 1). These odd ratios were statistically significant for all symptom categories (except for wheeze most days) and ranged from 3.88 to 5.76.

To assess the degree of persistence of skin test reactivity measures we examined children who had skin test performed during 3 or more surveys ($N=38$). Among those children who were skin test negative before age 8 years and skin test positive on the next test ($N=10$) only 60% remained positive on subsequent tests. In contrast, among those who were skin test positive prior to the cut off age ($N=18$), significantly more (95%) remained positive on subsequent tests ($p=0.02$). There were no children who were skin test positive before age 8 years who were skin test negative on their next test.

As an index of the degree of allergic response to skin tests we also compared the average wheal size of the 5 allergens within surveys. These results showed (Table 2) that children who were sensitized early, on the average had wheal sizes that were at least twofold greater than those sensitized later. Comparisons of average wheal sizes between the early and late sensitized subgroups, indicated that the mean trends with time did not differ statistically but, that the early sensitized subjects had significantly larger wheal sizes at all surveys. Similar trends were also observed when analyzing the mean wheal sizes within each of the 5 specific allergens (results not shown).

To determine if there were differences in mean levels of IgE between sensitivity subgroups, we used each individual's first available IgE measure. After converting them to Z-scores to adjust for age differences and skewness in the IgE distributions, we found that early sensitized children had significantly higher ($p < 0.001$) IgE levels (240 ± 52.0 , mean \pm SEM) compared to late and non-sensitized children (48.0 ± 92.0 and 25.0 ± 62.0 , respectively). There were no significant differences in IgE between the late and non-sensitized children.

Among the study participants we also looked at percent predicted FEV1 [22] within the different sensitization and symptom subgroups. The only clear trend was that subjects who reported having symptoms had significantly lower pulmonary function measures than those who did not report symptoms. However, there was no clear association between pulmonary function and age of skin test sensitization, even within symptomatic subjects.

To assess if the subjects selected for this study (N=133) were representative of the population as a whole, we compared their prevalence rates of SOBWZ to those of a sample of 1100 subjects that had at least one questionnaire response before the age of 8 years. We excluded questionnaire results taken before age 3 years, since skin testing was only done on subjects if they were 3 years of age or older. Within selected age strata, the prevalence rates of those included in the current analysis (N=133) were significantly higher than those observed in the general population (N=1100), in all three SOBWZ categories. This suggests a potential selection bias with subjects returning for multiple surveys having

more wheezing symptoms.

Discussion

This study has demonstrated that early sensitization to common aeroallergens is associated with increased prevalence of wheezy respiratory symptoms and elevated levels of total serum IgE, suggesting that early sensitization may be considered an important risk factor associated to asthma. Interestingly, late sensitization (after age 8) was unrelated to recurrent wheezing.

A similar study, designed to assess the effects of early sensitization, was conducted by Peat et al. [4] using a population sample of 380 Australian schoolchildren (age 8-11 years at enrollment). In this prospective study, children were administered skin prick tests, bronchial responsiveness tests using histamine, and respiratory health questionnaires at 2 year intervals over a 6 year period. With atopy defined as the presence of a skin wheal of ≥ 4 mm, they found 24% of the children were atopic at 8 to 10 years (early onset), and an additional 15% became atopic during the course of the study (late onset). The proportion of children with late onset sensitization was the same as that found in the current study. However, the current study had considerably more children (60%) who were sensitized early. This difference may be partially due to the use of differing wheal sizes for defining atopy (> 2 versus >4 mm) in the two studies. Peat et al. [4] also concluded that early onset atopy was an important risk factor for diagnosed asthma and continuing symptoms of wheeze.

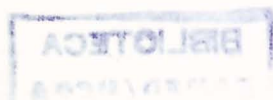
Risk factors associated with asthma symptoms in children (7-10 years of age) were also recently studied by Kuehr et al. [23], in a longitudinal study of 1812 children. During 4 annual surveys, participants answered respiratory health questionnaires and received skin prick test. Using multiple logistic regression models independently for each survey they demonstrated an increased risk of developing symptoms associated with mite allergen (OR 2.2 - 4.0) and to animal dander (OR 2.6 - 3.6), but found no significant risk associated with sensitization to pollens. Similar results were also reported by Sears et al. [24], in a longitudinal study of 714 New Zealand children, where they found sensitivity to house dust mite, cat dander and aspergillus fumigatus to be significantly independent risk factors associated with development of asthma. Since the allergens used in the current study did not include

animal dander and only included mite that was part of the house dust sample, our prevalence estimates for skin test sensitivity may be less than would be expected had animal dander and mite been included.

In this study we have demonstrated that early sensitization is related to developing wheezing symptoms and elevated total serum IgE levels, both of which are common markers of asthma. Similar findings were also reported by Dodge et al. [25]. Their study included 36 subjects whose onset of asthma was between age 10 and 20 years, which they defined as new diagnosis of asthma (NDA). Their results showed that NDA subjects had a significantly higher proportion of positive skin test results than controls, 56.5% versus 29.6% for controls, before they received the asthma diagnosis. They also reported significantly higher levels of total serum IgE, before the asthma diagnosis, among the NDA subjects when compared to controls (mean log IgE=2.27 in subjects with NDA, 1.76 in control subjects).

In our study, children were on average 6 years of age at their first skin test session, thus, we set our threshold for defining sensitization status at 8 years of age to insure sufficient numbers in each category. The finding that sensitization below age 8 is more closely associated with asthma markers and elevated serum IgE levels does not mean that this specific age marks a particular threshold. It is important to understand that sensitization events may, and certainly do, start much earlier in life. It is uncommon for children to be sensitized to aeroallergens before age 2 years [26], but they are already sensitized to food allergens as early as age 2 months. Thus, the 8 years "arbitrary" threshold serves only as a sensitive marker of earlier versus later sensitized individuals, probably identifying already predisposed subjects who have begun their "atopic march" long before this age.

A previous study by Buffum et. al. [27] also reported an increased prevalence of wheeze associated with skin test reaction to eggs. Based on the clinical experiences of 87 asthma patients, investigators reported that 19 had atopic dermatitis and "positive skin test for eggs" as infants and of these, 16 had wheezed during the previous year at the time of the last recorded visit. The author concluded that infants with atopic dermatitis and positive skin test to egg "are likely to have severe



asthma and are likely to have a serious time with it". In addition, he suggests that the degree of "hypersensitivity" (as determined by the presence of atopic dermatitis or positive skin reaction to eggs) in early life was directly proportional to prognosis in wheezy infants [27].

In a more recent study, Zeiger and Heller [28] carried out a prospective, randomized, controlled study of food allergens avoidance in infants of atopic parents in San Diego, CA. One group consisted of infants whose mothers avoided cow's milk, egg and peanut during the last trimester of pregnancy and during lactation, and who, themselves, avoided cow's milk until age 1 year, egg until age 2 years, and peanut and fish until age 3 years. The other group (controls) followed standard feeding practices. In spite of a marked reduction in food allergies and sensitization to milk proteins by age 2 years in the treated group, there was no difference between groups in any of the large number of allergy-related outcomes studied by age 7 years. However, children who developed food allergies by age 4 years were twice as likely to have asthma by age 7 years than those who did not and this was independent of early food avoidance treatment [28].

These studies [27,28] along with our findings strongly suggest that subjects who will subsequently develop asthma already have a tendency to be atopic and develop IgE-mediated responses to many stimuli, including foods, at a very early age. There seems to be a consistent pattern of sensitization to different antigens at different ages in the same individuals. This "atopic march" likely starts with food allergens and continues with aeroallergens. The exact mechanism for this sequence of events is not well understood. However, it has been postulated that the process by which sensitization to environmental allergens develops consists of allergen-driven T-cell selection in early life leading to deletion of food allergen specific T-cells via induction of specific anergy [29]. Concomitantly, selection and ultimately expansion of mutually exclusive Th-1 or Th-2- like reactivity against local aeroallergens would occur via immune deviation. This suggests that children who develop asthma become sensitized to different allergens depending on the area in which they live. These findings, together with those suggesting that prevention of exposure to foods and house dust

mites prevents sensitization to these allergens but does not prevent the development of asthma, suggest that it is not sensitization to these allergens that causes asthma in these subjects. More likely, an alteration in immune responsiveness may predispose both to asthma and to sensitization to aeroallergens, particularly in early life.

Acknowledgments

This research was supported by U.S. NHLBI SCOR Grant No. HL14136.

1. Adams PF, Marano MA. Current estimates from the National Health Interview Survey, 1994. *Vital Health Stat* 1995;10:94.
2. CDC, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Asthma-United States, 1980-1990. *MMWR* 1992;41(39):733-735.
3. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house dust mite allergen (Der p I) and development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med* 1990;323(8):502-7.
4. Peak JK, Salome CM, Woolcock AJ. Longitudinal changes in atopy during a 4-year period: Relation to bronchial hyperresponsiveness and respiratory symptoms in a population sample of Australian schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:65-74.
5. O'Keeffe PT, Young S, Arnott J, et al. Association between Der P I exposure and airway responsiveness in early infancy. *Eur Respir J* 1994;7(18):29.
6. Gibson NA, Palmer L, Young S, et al. Association between airway responsiveness (AR) at 1 month of age, and AR and development of asthma/atopy at 6 years of age. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:A468.
7. Martinez FD. Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood: Could they be protective? *Thorax* 1994;49(12):1189-1191.
8. Samet JM, Tager IB, Speizer FE. The relationship between respiratory illness in childhood and chronic air-flow obstruction in adulthood. *Am Rev Respir Dis* 1983;127:508-523.
9. Martinez FD. Passive smoking and respiratory disorders other than cancer. In: *Respiratory Health Effects of Passive Smoking*. p7-1 to 7-70. Office of Health and Environmental Assessment. Office of Research and Development, EPA, Washington DC 1992.
10. Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Martinez FD. Relationship of infant feeding to recurrent wheezing at age six. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995; in press.

11. Redline S, Tager IB, Segal MR, Gold D, Speizer FE, Weiss ST. The relationship between longitudinal changes in pulmonary function and nonspecific airway responsiveness in children and young adults. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:179-184.
12. Sherrill DL, Sears MR, Lebowitz MD, Holdaway M, Hewitt CJ, Flannery EM, Herbison GP and Silva PA. The effects of airway hyperresponsiveness, wheezing and atopy on longitudinal pulmonary function in children: a 6-year follow-up study. *Pediatric Pulmonol* 1992;13:78-85.
13. Szepfalusi Z, Huber WD, Ebner C, Granditsch G, Urbanek R. Early sensitization to airborne allergens. *Intl Arch Allergy Immunol* 1995;107(4):595-598.
14. Delacourt C, Labbe D, Vassault A, Brunet-Langot D, de Blic J, and Scheinmann P. Sensitization to inhalant allergens in wheezing infants is predictive of the development of infantile asthma. *Allergy* 1994;49(10):843-847.
15. Lebowitz M, Knudson R, Burrows B. Tucson epidemiologic study of chronic obstructive lung diseases. I. Methodology and prevalence of disease. *Am J Epidemiol* 1975;102:137-152.
16. Pepys J. Skin tests in diagnosis. In: Gell PGH, Coombs RRA, Lachman PJ. Editors: *Clinical aspects of immunology*. Oxford, 1975, Blackwell Scientific Publications, p. 55.
17. Barbee RA, Halonen M, Kaltenborn W, Lebowitz M, Burrows B. A longitudinal study of serum IgE in a community cohort: correlations with age, sex, smoking, and atopic status. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:919-927.
18. Sherrill DL, Halonen M, Burrows B. Relationships between total serum IgE, atopy and smoking: a twenty-year follow-up analysis. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:954-962.
19. Halonen M, Stern D, Lyle S, Wright AL, Taussig LM, Martinez FD. Relationship of total serum IgE levels in cord and nine month sera of infants. *Clin Exp Allergy* 1991;21:235-41.
20. Sneller MR, Hayes HD, Pinnas JL. Pollen changes during five decades of urbanization in Tucson, Arizona. *Ann of Allergy* 1993; 71(6):519-24.

21. Jones RH. Longitudinal data with serial correlation: A statespace approach. 1993; Chapman and Hall, London.
22. Sherrill DL, Lebowitz MD, Knudson RJ, Burrows B. Continuous longitudinal regression equations for pulmonary function measures. *Eur Respir J* 1992;5:452-462.
23. 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;95:655-62.
24. Sears MR, Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Silva PA. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1989;19:419-24.
25. Dodge R., Burrows B., Lebowitz MD., Cline MG. Antecedent features of children in whom asthma develops during the second decade of life. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92(5):744-9.
26. Heymann PW, Rakes, GP, Hogan AD, Ingram JM, Hoover GE, Platts-Mills. Assessment of eosinophils, viruses and IgE antibody in wheezing infants and children. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:380-382.
27. Buffum W. The prognosis of asthma in infancy. *J Allergy* 1995 30:165-9.
28. Zeiger R, 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;95:1179-85.
29. Holt P, O'Keeffe P, Holt B. T-cell "priming" against environmental allergens in human neonates: sequential deletion of food antigen reactivity during infancy with concomitant expansion of responses to ubiquitous inhalant allergens. *Pediatr Allergy Immuno* 1995:85-9.

Table 1

Estimated Odds Ratios for Early Sensitized Subjects†

SOBWZ	Odds Ratio	95% Confidence Interval
Rarely	4.51 §	2.01 - 10.10
Occasionally	5.76 §	2.54 - 13.07
Any	4.13 §	1.97 - 8.66
Wheeze		
Most Days	2.83	0.81 - 9.84
Apart from Colds	3.88 §	1.81 - 8.28

§ p-value < 0.05

† Relative to non and late sensitized individuals combined.

Table 2

Average Wheal Size (Mean \pm Standard Deviation) by Time of Sensitization and Survey.

	Survey 1	Survey 6	Survey 7	Survey 11
Sensitization				
Late	NA	1.73 \pm 1.96	2.51 \pm 3.66	2.59 \pm 1.64
Early†	2.34 \pm 1.93	4.22 \pm 2.76	8.45 \pm 8.61	5.71 \pm 2.52

† p-value < 0.05 (different at all surveys compared to late sensitized children using REM analysis, see text for details)

Figure Legends:

Figure 1

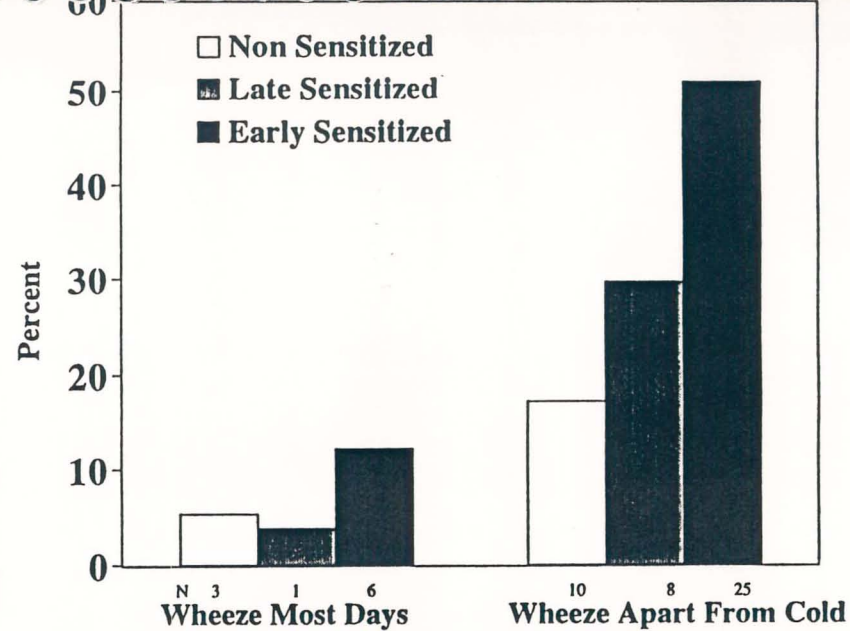
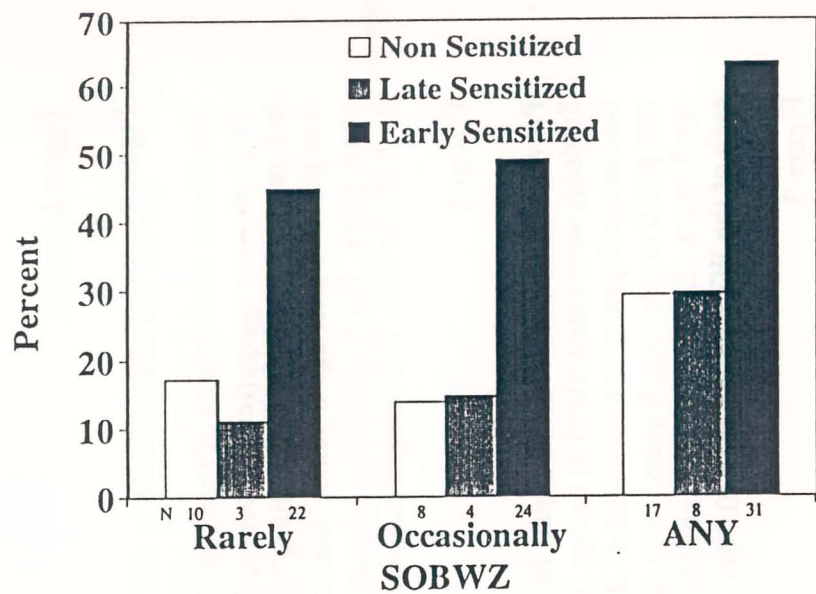
Prevalence of shortness of breath with wheeze (SOB WZ) by categories of skin test sensitization. Subjects were categorized as being; "early sensitized" if they had at least one positive skin test result before age 8 years; "late sensitized" if their skin test(s) was negative before age 8 years and at least one was positive after age 8 years; "non sensitized" if all skin test results were negative before and after age 8 years. Early sensitized subjects had a significantly higher proportion of reported symptoms in each of the SOB WZ categories ($p < 0.001$).

Figure 2

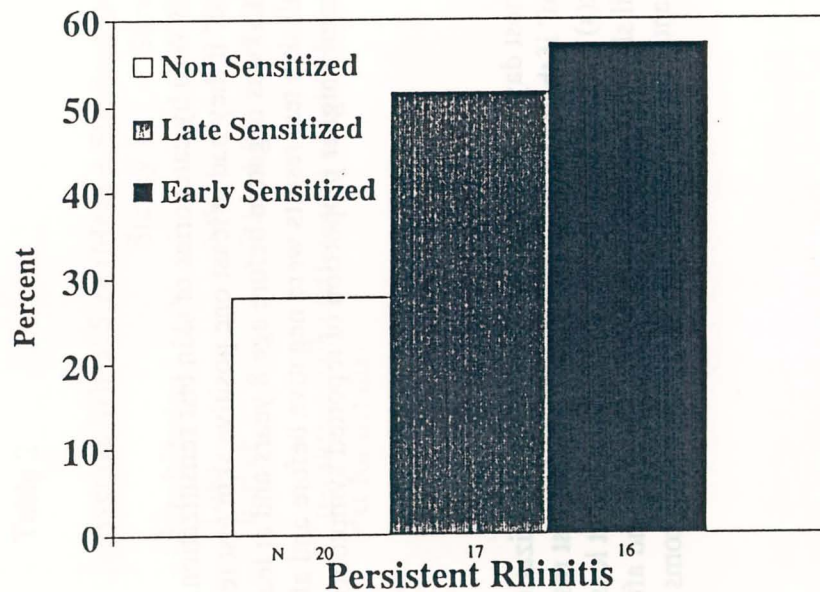
Prevalence of wheeze (WZ), apart from colds and most days, by categories of skin test sensitization. Subjects were categorized as being; "early sensitized" if they had at least one positive skin test result before age 8 years; "late sensitized" if their skin test(s) was negative before age 8 years and at least one was positive after age 8 years; "non sensitized" if all skin test results were negative before and after age 8 years. Early sensitized subjects had a significantly higher proportion of reported symptoms in each of the WZ categories ($p < 0.001$).

Figure 3

Prevalence of persistent rhinitis by categories of skin test sensitization. Subjects were categorized as being; "early sensitized" if they had at least one positive skin test result before age 8 years; "late sensitized" if their skin test(s) was negative before age 8 years and at least one was positive after age 8 years; "non sensitized" if all skin test results were negative before and after age 8 years. There was no significant difference between prevalence rates of the early and late sensitized subjects.



3



ANEXO 5

CHILDREN'S RESPIRATORY STUDY

Year 2

Enrolled Child Questionnaire

The questionnaire should be completed by the parent for:

All questions pertain only to mother's health.

Each question should be answered by circling the number of the best answer or by filling in a space with a number or word.

1. Where do you live in the United States?

- 1. Yes
- 2. No

Please answer all questions as accurately as possible. If you do not know the answer to a question, please put "N/A" in the space provided.

To protect your privacy we will keep the answers to these questions confidential.

Thank you for your cooperation in providing us with this information. We will contact you if we need any further information.



CHILDREN'S RESPIRATORY STUDY

Year 2

Enrolled Child Questionnaire

This questionnaire should be completed by the parent for:

All questions pertain only to his/her health.

The questions can be answered by circling the number of the best answer or by filling in a blank with a number or word.

Example: Do you live in the United States?

- ① Yes
2. No

Please answer all questions as accurately as possible. If you desire help in answering a question, please put a checkmark (✓) in front of the question number.

As with all information we collect, the answers to these questions will be kept confidential.

Thank you for your cooperation in providing us with this important information, and for your continued participation in the Children's Respiratory Study.

Card #: CRS 201

(1-6)

ID #:

(7-11)

Today's date: ___ / ___ / ___
Mo. Day Yr.

(12-17)

Is the personal information on the front cover correct? (IF NOT, PLEASE MAKE THE NECESSARY CORRECTIONS.)

- 1. Yes
- 2. No

(18)

1. Child's date of birth

___ / ___ / ___
Mo. Day Yr.

(19-24)

2. Child's birth weight

___ lbs. ___ oz.

(25-28)

3. Sex

- 1. Male
- 2. Female

(29)

4. Did the child have any medical problems right after birth which delayed his/her discharge from the hospital?

(30)

- 1. Yes
- 2. No

6. Does this child cough during or shortly after vigorous exercise?

1. Yes, usually
2. Yes, occasionally
3. No

(44)

7a. Has his/her chest ever sounded wheezy or whistling?

1. Yes
2. No . . . SKIP TO QUESTION 8

(45)

IF YES TO QUESTION 7a:

b. Has this occurred with colds?

1. Yes
2. No

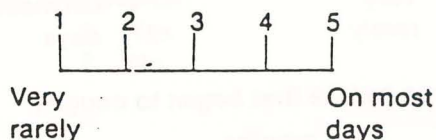
(46)

c. Has this child's chest ever sounded wheezy or whistling apart from colds?

1. Yes
2. No

(47)

d. How often has this child had the wheezing or whistling?



(48)

e. How old was this child when his/her chest first sounded wheezy or whistling?

— months

(49-50)

f. At what age did he/she stop wheezing or whistling?

— months

(51-52)

OR: check here if child is still wheezing

(53)

g. Has this child's wheezing/whistling occurred as attacks?

1. Yes
2. No

(54)

h. Has this child ever been awakened at night by wheeze or by shortness of breath?

1. Yes
2. No

(55)

i. Has he/she ever seen a doctor about the wheeze?

1. Yes
2. No

(56)

j. Has this child ever taken any medicine for wheeze?

1. Yes, prescribed by doctor
2. Yes, not prescribed by doctor
3. No

(57)

10. Is this child more short of breath than most children of the same age?

(70)

1. Yes
2. No

Card #: CRS 202

(1-6)

ID Dup _____

(7-11)

11a. Has your child **ever** had asthma (reactive airways disease)?

1. Yes
2. No . . . SKIP TO QUESTION 12a

(12)

IF YES TO QUESTION 11a:

b. How old was this child when the symptoms first began?

(13-14)

____ months

c. How old was he/she when the last attack occurred?

(15-16)

____ months

OR: check here if child still has asthma:

(17)

d. How old was this child when you were first told by a doctor that he/she had asthma?

(18-19)

____ months

OR: check here if doctor never said he/she had asthma:

(20)

e. **During the past year**, how many asthma attacks did he/she have?

(21)

1. No attacks
2. A few (1-3) attacks
3. Several (4-12) attacks
4. Many (13 or more) attacks
5. Attacks almost every day

f. **During the past year**, did this child take any medicine for asthma?

(22)

1. Yes, prescribed by a doctor
2. Yes, not prescribed by a doctor
3. No

13a. Has your child ever had croup?

1. Yes
2. No . . . SKIP TO QUESTION 14a

(35)

IF YES TO QUESTION 13a:

b. Was this diagnosed by a doctor?

1. Yes
2. No

(36)

c. Did the child have one or more episodes of croup?

1. One episode
2. More than one episode

(37)

d. At what age did the child have the first episode?

___ months

(38-39)

e. How old was this child when he/she had the last such episode?

___ months

(40-41)

14a. Has your child ever had bronchiolitis, or any wheezing illness in the first year of life not due to asthma?

1. Yes
2. No . . . SKIP TO QUESTION 15a

(42)

IF YES TO QUESTION 14a:

b. Was this diagnosed by a doctor?

1. Yes
2. No

(43)

c. Did the child have one or more episodes of bronchiolitis?

1. One episode
2. More than one episode

(44)

d. At what age did the child have the first episode?

___ months

(45-46)

e. How old was this child when he/she had the last such episode?

___ months

(47-48)

15a. Has your child **ever** had pneumonia?

1. Yes
2. No . . . SKIP TO QUESTION 16

(49)

IF YES TO QUESTION 15a:

b. Was this diagnosed by a doctor?

1. Yes
2. No

(50)

c. Did the child have one or more episodes of pneumonia?

1. One episode
2. More than one episode

(51)

d. At what age did the child have the first episode?

___ months

(52-53)

e. How old was this child when he/she had the last such episode?

___ months

(54-55)

16. **During the past year**, for how many days has this child been unable to do his/her usual activities because of illnesses such as chest (not head) colds, bronchitis, asthma or pneumonia?

___ days

(56-58)

17. How many head colds (common colds) **per year** does this child usually have?

1. Few (0-3 per year)
2. Some (4-5 per year)
3. Frequent (6-9 per year)
4. Constant (more than 9 per year)

(59)

18a. Has your child **ever** had hay fever or any other condition that makes his/her nose runny, stuffy, or itchy **apart** from colds?

1. Yes
2. No . . . SKIP TO QUESTION 19

IF YES TO QUESTION 18a:

b. How old was your child when you first noticed this condition? (61-

___ months

c. How old was this child when he/she stopped having this condition? (63-

___ months

OR: check here if child still has condition (6

d. When this child has the runny or stuffy nose, does he/she also usually: (6

Cough?

1. Yes 2. No (6

Wheeze?

1. Yes 2. No (6

Have shortness of breath?

1. Yes 2. No (6

19. Has this child **ever** had allergies which cause nose, eye or lung problems? (6

1. Yes
2. No

20. Has a doctor **ever** told you that this child had sinus trouble? (7

1. Yes
2. No

21a. Has this child **ever** been allergic to any food? (7

1. Yes
2. No

b. Has he/she **ever** been allergic to any medicine? (7)

1. Yes
2. No

22a. Has this child ever had eczema (allergic skin rash)?

1. Yes
2. No . . . SKIP TO QUESTION 23a

(73)

IF YES TO QUESTION 22a:

b. Has a doctor told you this child had eczema?

1. Yes
2. No

(74)

c. At what age did the eczema begin?

___ months

(75-76)

d. How old was this child when he/she last had eczema?

___ months

(77-78)

OR: check here if child still has eczema

(79)

Card #: CRS 203

(1-6)

ID Dup _____

(7-11)

23a. Was this child breast fed?

1. Yes
2. No . . . SKIP TO QUESTION 24

(12)

IF YES TO QUESTION 23a:

b. For how many months was this child breast fed?

1. Less than 1 month
2. 1-3 months
3. 4-6 months
4. more than 6 months

(13)

24. At what age was formula introduced?

1. Never
2. less than 1 month
3. 1-3 months
4. 4-6 months
5. more than 6 months

(14)

25. At what age was cow's milk (nonformula) started?

1. Never
2. Less than 1 month
3. 1-3 months
4. 4-6 months
5. 7-9 months
6. 9-11 months
7. 12 or more months

(15)

26. At what age did he/she begin to receive table foods? (16)
1. less than 1 month
 2. 1-3 months
 3. 4-6 months
 4. 7-9 months
 5. more than 9 months

- 27a. Did the mother smoke cigarettes while she was **pregnant** with this child? (17)
1. Yes
 2. No . . . SKIP TO QUESTION 28a

IF YES TO QUESTION 27a: _____

- b. What was the average number of cigarettes she smoked per day during this pregnancy? (ONE PACK CONTAINS 20 CIGARETTES) (18)
1. less than 3
 2. 3-10
 3. 11-20
 4. more than 20

- 28a. Has the mother smoked at all **since** this child was born? (19)
1. Yes
 2. No . . . SKIP TO QUESTION 29a

IF YES TO QUESTION 28a: _____

- b. For how many months did the mother smoke since this child was born? (20-21)
- _____ months
- c. On the average, how many of **each** of the following did she smoke **per day** during that time? (NOTE: ONE PACK CONTAINS 20 CIGARETTES)
- | | |
|------------------------------|---------|
| _____ cigarettes | (22-23) |
| _____ pipes | (24-25) |
| _____ cigars | (26-27) |
| _____ non-tobacco cigarettes | (28-29) |
- d. How often has the mother smoked in the same room with this child? (30)
1. Never
 2. Occasionally
 3. Frequently

- 29a. Has the father smoked at all since the child was born? (31)
1. Yes
 2. No . . . SKIP TO QUESTION 30

IF YES TO QUESTION 29a: _____

- b. For how many months did the father smoke since this child's birth? (32-33)
- _____ months
- c. On the average, how many of **each** of the following did he smoke **per day** during that time? (NOTE: ONE PACK CONTAINS 20 CIGARETTES.)
- _____ cigarettes (34-35)
- _____ pipes (36-37)
- _____ cigars (38-39)
- _____ non-tobacco cigarettes (40-41)
- d. How often has the father smoked in the same room with this child? (42)
1. Never
 2. Occasionally
 3. Frequently

30. Did any other household member regularly smoke in the house since this child's birth? (43)
1. Yes
 2. No

31. Does this child spend 9 or more hours per week in the company of other children (not including his or her brothers and sisters) such as at a babysitter's home or day care? (44)
1. Yes
 2. No

32. How many brothers and sisters (including half siblings) does this child have? (45-46)
- _____

- 33a. Are there any other children living in your household **besides** this child and all of his/her siblings? (47)
1. Yes
 2. No . . . SKIP TO QUESTION 34

IF YES TO QUESTION 33a: _____

- b. How many children other than this child and his/her siblings live in your house? (48-49)
- _____

34. How is your home heated? (IF MORE THAN ONE, PLEASE CIRCLE ALL TYPES.) (50)
1. steam or hot water
 2. central gas furnace
 3. wall or floor gas furnace
 4. electric
 5. other
 6. don't know
35. What fuel is used most for cooking in your home? (51)
1. electricity
 2. gas
 3. fuel oil
 4. other
 5. don't know
- 36a. Do you have a ventilator fan for your stove? (52)
1. Yes
 2. No
- b. How often do you use your ventilator fan when cooking? (53)
1. do not have ventilator fan
 2. never
 3. occasionally
 4. frequently
37. Finally, may we inform this child's doctor of the results of this study? (54)
1. Yes . . . Doctor's name _____
Location _____

 2. No

THANK YOU FOR YOUR COOPERATION

