

VALÉRIA BOTAN GONÇALVES

**Influência do montelucaste sobre o estado de
ativação dos eosinófilos e função dos fagócitos em
crianças asmáticas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Brasília/DF

2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Influência do montelucaste sobre o estado de ativação dos eosinófilos e função dos fagócitos em crianças asmáticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular/ Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. MARIA IMACULADA MUNIZ BARBOZA JUNQUEIRA

Brasília/DF

2010

Este trabalho foi desenvolvido com recursos de bancada da pós-graduação em Patologia Molecular/PROF/CAPES e recursos de bancada da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a um ser de luz que Deus colocou no meu caminho, que esteve ao meu lado em todos os momentos de fracassos e vitórias da minha vida. É um exemplo de dedicação, virtude e resignação.

A você, minha mãe Marilisa, esta e todas as conquistas da minha vida também são suas!

AGRADECIMENTOS

“... é impossível ser feliz sozinho...”

Tom Jobim

A Deus e aos Espíritos Protetores, pela vida e todo caminho semeado para realização deste trabalho.

Ao meu pai Adalberto, por ter me dado as ferramentas necessárias para meu crescimento pessoal e espiritual.

Ao meu namorado Cristiano Fernandes, por ser meu “sinal” de amor e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

A professora e orientadora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, pelo carinho e compreensão com os quais me acompanhou neste trabalho; por ser exemplo de ética, dedicação profissional e bondade e por ter me ensinado a ser uma pessoa melhor.

Ao Dr. Wellington Gonçalves Borges, preceptor do Serviço de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Base do Distrito Federal, por ter me ensinado que é com dedicação e amor que se realiza a verdadeira medicina, por toda confiança em mim depositada e por acreditar que a cada dia eu posso ser um pouco melhor do que ontem. És meu exemplo nesta vida profissional que abracei.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Tosta, pelos ensinamentos e pelo estímulo para eu continuar no estudo da Imunologia.

Ao Professor Dr. Paulo César de Jesus, diretor da Faculdade de Medicina, por todo apoio institucional e pelo apoio para compra dos placebos.

Aos profissionais técnicos do Laboratório de Imunologia Celular da

Faculdade de Medicina da Unb, Marthina Gomes e Shirley Claudino Couto, por todo apoio na realização dos experimentos e pela amizade que desenvolvemos ao longo deste período.

À Dra. Marta de Fátima Guidacci, amiga e coordenadora do Programa de Atendimento ao Paciente Asmático da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, pelo auxílio na elaboração deste projeto e na liberação dos medicamentos necessários para o trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Imunologia do Hospital de Base do Distrito Federal, em especial à técnica Roméria Viana Rodrigues, pelo auxílio nos experimentos.

À Rita Mendes, Silvana Jacarandá, Luciana Monte, Juliana Horta e Emanuelle Pedrosa, médicas do Serviço de Pneumologia Pediátrica do Hospital de Base do Distrito Federal, pelo apoio e encaminhamento de muitos pacientes desta pesquisa.

À Érica Tinoco, Vanúzia Magalhães e Cecília Silva, médicas residentes do Serviço de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Base do Distrito Federal, pelo apoio nas tardes de segundas-feiras.

Às amigas Vivian Rêgo, Daniela Abreu e Renata Seixas pela árdua tarefa de conseguir crianças voluntárias e sadias para este projeto.

À Ana Cristina Bezerra, endocrinologista pediátrica, pelo auxílio na análise nutricional dos pacientes.

À colega Selma Kückelhaus, pelas palavras alegres nos momentos em que eu estava desanimada.

As colegas de pós graduação Carmem Livia Martins e Érica Alessandra Rocha Alves, por compartilhar dos momentos de elaboração deste estudo.

Ao Sr. José Siqueira da Silva, técnico do Laboratório de Imunologia Celular, pela confecção das lâminas que foram utilizadas neste trabalho.

A toda equipe de bioquímicas do laboratório do Hospital das Forças Armadas pela atenção e auxílio a mim cedidos.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UnB, Jaqueline Almeida, Danielle Miranda, Alessandro Ribeiro e Uédson Ayres.

Em especial, a todas as crianças e adolescentes que participaram desta pesquisa. Muito obrigada!

*“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele
lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”*

Goethe

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	12
INDIVÍDUOS, MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
1. Delineamento dos experimentos.....	15
2. Grupo de Estudo e Caracterização dos indivíduos.....	19
2.1. Avaliação clínica inicial dos indivíduos.....	20
2.2. Critérios de Inclusão dos pacientes asmáticos.....	21
2.3. Critérios de Exclusão dos pacientes asmáticos.....	21
2.4. Contra-indicações gerais para o dia da coleta de sangue.....	22
2.5. Critérios para início do montelucaste e randomização dos pacientes.....	22
2.6. Avaliação clínica pós-tratamento.....	23
2.7. Crianças e adolescentes saudáveis.....	23
3. Avaliação da influência do montelucaste sobre o estado de ativação dos eosinófilos de crianças e adolescentes asmáticos, por parâmetros morfológicos.....	24
4. Influência do montelucaste sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos de crianças e adolescentes asmáticos, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.....	25
4.1. Preparação da suspensão de estoque de leveduras para o teste de fagocitose.....	26
4.2. Preparação da suspensão de leveduras para a utilização no teste de fagocitose.....	27
5. Influência do montelucaste sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos de crianças asmáticas, pelos receptores para opsoninas.....	28
5.1. Sensibilização das leveduras com componentes do complemento e anticorpos.....	28
6. Influência do montelucaste sobre a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos de crianças asmáticas, pelo teste do <i>nitroblue tetrazolium</i>.....	28
7. Análise estatística.....	29
RESULTADOS.....	31
1. Achados clínicos dos pacientes asmáticos e controles.....	32
1.1. Fase pré- tratamento.....	32
1.2. Fase pós-tratamento.....	36
1.3. Avaliação dos eosinófilos periféricos na fase pós-tratamento..	38
2. Avaliação dos parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos.....	39
2.1. Estado de ativação dos eosinófilos dos indivíduos asmáticos antes de iniciar o tratamento com montelucaste ou placebo, fora do período da crise.....	39
2.2. Análise comparativa do estado de ativação dos eosinófilos entre os três grupos na fase inicial de tratamento.....	42
2.3. Comparação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos	

entre os indivíduos tratados com montelucaste ou placebo após 12 semanas.....	45
2.4. Influência do montelucaste sobre os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos em crianças e adolescentes asmáticos.....	48
2.5. Influência do montelucaste sobre a ativação dos eosinófilos segundo os diferentes tratamentos profiláticos realizados pelos pacientes asmáticos.....	52
3. Influência do montelucaste sobre a capacidade de produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos, avaliada pelo teste do <i>Nitroblue tetrazolium</i> (NBT).....	54
3.1. Teste do NBT basal.....	55
3.2. Teste do NBT estimulado.....	58
4. Capacidade fagocitária dos neutrófilos de crianças asmáticas e controles.....	59
4.1. Influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos de indivíduos asmáticos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.....	59
4.2. Influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos de indivíduos asmáticos pelos receptores para opsoninas.....	63
5. Capacidade fagocitária dos monócitos de crianças asmáticas e controles.....	66
5.1. Influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos asmáticos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.....	66
5.2. Influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos asmáticos pelos receptores para opsoninas.....	69
DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS.....	108
1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UnB.....	109
2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF.....	111
3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Asmático	113
4. Protocolo Clínico de Pesquisa.....	116
5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Menor Sadio).....	119
6. Perfil das crianças e adolescentes asmáticos alocados aleatoriamente no grupo montelucaste.....	121
7. Perfil das crianças e adolescentes asmáticos alocados aleatoriamente no grupo controle.....	124
8. Perfil das crianças e adolescentes controles sadios.....	127
9. Atlas colorido – parâmetros morfológicos e teste NBT.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HPETE	5(S)-hidroperóxido-6(E),8(Z)-11(Z),14(Z)-eicosatetraenóico
5-LO	Enzima 5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AIE	Asma induzida pelo exercício
ATP	Adenosina trifosfato
CCR3	Receptor de quimiocina tipo 3
CD11b	Cluster of Differentiation 11b (integrina alfa)
CD28	Cluster of Differentiation 28 (co-estimulatória)
CD4⁺CD25⁺	Subpopulação de linfócito T regulatório
CXCL	Ligante CXC de quimiocina
CysLT1	Cys-leucotrienos 1
DF	Distrito Federal
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilos
FasL	Fas ligand
FCεRI	Receptores de alta afinidade para IgE
FEV1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
FLAP	Proteína ativadora da 5-lipoxigenase
GATA-3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor 3
GINA	Global Initiative for Asthma
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
ISAAC	Internacional Study for Asthma and Allergies in Childhood
LT	Leucotrienos
MMP	Matriz de metaloproteinase
MS	Ministério da Saúde Brasileiro
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NFκB	Fator nuclear κB

NO	Óxido nítrico
PFE	Pico de fluxo expiratório
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PMP	Padrões moleculares de patógenos
ARNm	Ácido ribonucléico mensageiro
r^P	Coeficiente de correlação de Pearson
r^S	Coeficiente de correlação de Spearman
SCF	Stem-cell factor
STAT-6	Signal transducer and activator of transcription-6
STF	Solução salina tamponada com fosfato
SUS	Sistema Único de Saúde
Ta1	Subpopulação de linfócito T auxiliar 1
Ta17	Subpopulação de linfócito T auxiliar 17
Ta2	Subpopulação de linfócito T auxiliar 2
TCR	Receptor do linfócito T
TGF-α	Fator de crescimento transformante alfa
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócito T regulatório
VEF₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

RESUMO

A asma é uma das doenças crônicas mais comuns na infância e sua prevalência e gravidade vem aumentando em várias partes do mundo nos últimos anos. A principal característica da asma é a inflamação das vias aéreas inferiores, responsável pela hiperresponsividade brônquica e limitação variável ao fluxo aéreo, reversível com ou sem tratamento. Várias células desempenham papel importante neste processo inflamatório como os eosinófilos, neutrófilos e monócitos. Na asma, os leucotrienos estão implicados em múltiplos mecanismos fisiopatogênicos incluindo: hipersecreção de muco, aumento da permeabilidade microvascular, prejuízo na atividade ciliar, recrutamento de células inflamatórias, edema e disfunção neuronal. Foi demonstrado que o montelucaste, antileucotrieno, é capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuir a quimiotaxia e a meia-vida dos eosinófilos. Entretanto, falta ainda um maior esclarecimento da influência do montelucaste sobre a ativação dos eosinófilos e funções dos monócitos e neutrófilos em indivíduos asmáticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do montelucaste sobre o estado de ativação dos eosinófilos e sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos e monócitos e produção de radicais livres, em crianças com asma persistente. Foram selecionadas 83 crianças asmáticas que foram alocadas, aleatoriamente, para receber tratamento com montelucaste ou placebo, por 12 semanas, e 10 crianças controles saudáveis, das quais foram retirados de 1 a 10 ml de sangue periférico, após consentimento informado. O estado de ativação dos eosinófilos do sangue periférico foi avaliado por parâmetros morfológicos após aderência destas células à lâmina, antes e após 12 semanas de tratamento com o montelucaste ou placebo. Os seguintes parâmetros morfológicos foram quantificados: eosinófilos normais, espraiamento, arredondamento, presença de pseudópodes localizados e generalizados, emissão de grânulos de pequena, moderada e grande quantidade, presença de vacúolos, presença de grânulos isolados, degeneração celular e comunicação celular. Quanto aos fagócitos, tanto a capacidade fagocitária dos neutrófilos e monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (rPMP) quanto pelos receptores para opsoninas foram analisados. O índice fagocitário foi determinado pela multiplicação da média de *Saccharomyces cerevisiae* aderidas/ingeridas por fagócito pelo percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose. A avaliação da capacidade oxidativa dos fagócitos foi feita pelo teste do *nitroblue tetrazolium*. Observamos que o número de eosinófilos com aspecto normal no sangue periférico apresentava correlação inversa com a gravidade do quadro asmático, enquanto que a emissão de pseudópodes generalizados e grânulos isolados mostravam correlação positiva com a gravidade da asma. O tratamento com o montelucaste foi capaz de diminuir o número de eosinófilos no sangue periférico, aumentar a proporção de eosinófilos com aspecto normal e diminuir a proporção de eosinófilos arredondados e a liberação de grânulos isolados após 12 semanas do tratamento com montelucaste, quando comparado ao grupo placebo. Quanto à capacidade de redução do corante NBT, não houve diferença entre os indivíduos asmáticos e controles saudáveis antes de iniciar o tratamento, porém observamos que os asmáticos reduzem o NBT de forma mais intensa que os saudáveis. Após 12 semanas de tratamento com o montelucaste, houve uma diminuição do potencial de redução forte em ambos os grupos tratados com placebo ou montelucaste. Observou-se menor índice fagocitário dos neutrófilos

para receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos nos indivíduos asmáticos quando comparado ao controle. E o montelucaste apenas diminuiu o índice fagocitário dos monócitos para receptores de opsoninas quando comparado ao placebo. Mostramos, de forma inédita, que o montelucaste é capaz de alterar os parâmetros de ativação dos eosinófilos correlacionados com a gravidade clínica e que este método utilizado para avaliar a ativação dos eosinófilos é acurado, de fácil realização e pode ser um marcador do processo inflamatório da asma e poderia ser utilizado para o acompanhamento do tratamento de indivíduos com asma.

ABSTRACT

Asthma is one of the most common chronic diseases in childhood and its prevalence and severity are increasing in many parts of the world in recent years. The main characteristic of asthma is inflammation of the lower airways, responsible for bronchial hyperresponsiveness and variable airflow limitation, reversible with or without treatment. Several cells play an important role in inflammation as eosinophils, neutrophils and monocytes. In asthma, the leukotrienes are implicated in multiple physiopathological mechanisms including mucus hypersecretion, increased microvascular permeability, impaired ciliary activity, recruitment of inflammatory cells, edema and neuronal dysfunction. It was shown that montelukast, antileukotriene, is able to inhibit the production of proinflammatory cytokines, decreasing chemotaxis and half-life of eosinophils. However, the influence of montelukast on the activation of eosinophils and phagocytic functions of monocytes and neutrophils in asthmatic subjects are not clear yet. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of montelukast on the state of activation of eosinophils, the phagocytic capacity of neutrophils and monocytes and the production of free radicals by phagocytes in children with persistent asthma. It was selected 83 asthmatic children that were randomly assigned to treatment with montelukast or placebo for 12 weeks and 10 healthy control children. Peripheral blood (1 to 10 ml) was taken from the children after parents informed consent. The state of activation of peripheral blood eosinophils was assessed by their morphological parameters after adherence to slide, before and after 12 weeks of treatment with montelukast or placebo. The following morphological parameters were evaluated: normal eosinophils, spreading, rounding, presence of localized and generalized pseudopods, release of small, moderate and large quantity of granules, cytoplasmic vacuoles, cluster of free eosinophils granules, cell degeneration and cell communication. The monocyte and neutrophil phagocytic capacity were assessed through pathogen-associated molecular patterns receptors (PAMP) and through opsonin receptors. The phagocytic index was calculated as the average number of ingested *Saccharomyces cerevisiae* per phagocyte multiplied by the percentage of cells engaged in phagocytosis. The oxidative capacity was assayed by the nitroblue tetrazolium (NBT) test. The number of eosinophils with normal feature in peripheral blood showed an inverse correlation with the severity of asthma, while the emission of widespread pseudopods and isolated granules showed positive correlation with the severity of asthma. Treatment with montelukast was able to reduce the number of eosinophils in peripheral blood, and to increase the proportion of eosinophils with normal feature. The drug was also able to decrease the proportion of eosinophils with rounded feature and that releasing free eosinophil granules after 12 weeks of treatment compared to placebo. There was no difference in the percent reduction of NBT dye between asthma individuals and healthy controls before starting treatment, but individuals with asthma showed a stronger reduction of NBT than the healthy one. After 12 weeks of treatment with montelukast, there was a decrease in the power of reduction in both groups treated with placebo or montelukast. The neutrophil phagocytic index through pathogen-associated molecular patterns receptors in asthma individuals was lower than that of healthy control individuals. Montelukast treatment decreased the phagocytic index of monocytes through opsonin receptors when compared to placebo. Our data showed, for the first time, that montelukast is able to modify the activation of eosinophils correlated with clinical severity and that the

method used to assess eosinophil activation is accurate, easy to perform and can be a marker of inflammation in asthma, and it could be used to the follow up of treatment of asthma individuals.

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo. Manifesta-se, clinicamente, por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar (IV Diretrizes para Manejo da Asma, 2006). Os mecanismos que influenciam o desenvolvimento e expressão da asma são complexos e interativos (Global Initiative for Asthma, 2008). Existe uma forte associação com fatores genéticos, como a tendência a uma maior produção de IgE (Holloway e cols., 1999) e o desvio para via T auxiliar do tipo 2 (Ta2) (Wiesch e cols., 1999) e com fatores ambientais, como a exposição a aeroalérgenos, tabagismo e dieta (Global Initiative for Asthma, 2008).

É uma doença de prevalência e morbidade crescentes e já adquiriu dimensões de um problema de saúde pública. Estima-se que 300 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo. Anualmente, ocorrem 250.000 mortes por ano devidas a quadros de exacerbações da asma (Global Initiative for Asthma, 2008). Faltas escolares e ao trabalho têm mostrado um grande impacto social e econômico em estudos realizados nos Estados Unidos, Índia, América Latina e Reino Unido (Neffen e cols., 2005; Mahapatra e cols., 1993), sendo que a asma é a principal causa de faltas ao trabalho em países como Estados Unidos, Suíça e Reino Unido (Karr e cols., 1978). O custo do tratamento de pacientes asmáticos é substancial, estimando-se gastos da ordem de seis bilhões de dólares nos Estados Unidos. Acredita-se que o custo sócio-econômico desta doença supere os gastos combinados de infecções como tuberculose e a síndrome da imunodeficiência adquirida (Lima e cols., 2002).

No Brasil, a prevalência varia de 10 a 20% dependendo da região e da faixa etária considerada. Anualmente, ocorrem cerca de 350.000 internações por asma, constituindo a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (IV Diretrizes para Manejo da Asma, 2006) e a terceira causa de hospitalização entre crianças e adultos jovens.

É a causa mais freqüente de atendimento nas emergências, principalmente na faixa etária pediátrica, demonstrando que a doença penaliza as crianças e suas famílias.

Um estudo multicêntrico (Internacional Study for Asthma and Allergies in

Childhood – ISAAC) apontou ser a prevalência mundial de asma em torno de 11,6% entre escolares e 13,7% entre adolescentes. No Brasil, o ISAAC – fase III mostrou uma elevada prevalência, de 24,3%, de asma brônquica pediátrica (Solé e cols., 2006). Em Brasília, os dados mostraram prevalência de asma ativa (sibilos nos últimos 12 meses) de 19,7% entre crianças e adolescentes. Comparando-se com os estudos de Pearce e colaboradores (2006), o Brasil é o país da América Latina com prevalência mais alta de pacientes asmáticos.

No Distrito Federal, mais especificamente no ano de 2005, 4.160 asmáticos foram internados, correspondendo a 3% do total de internações o que representou um custo público de R\$ 1.231.517,00. A faixa etária predominante de internações foi de 0 a 4 anos (DATASUS, 2009).

No Brasil, ocorrem cerca de 2.500 óbitos por ano devidos à asma, seis a dez pacientes asmáticos morrem por dia e a grande maioria destes não estava sob tratamento ambulatorial (DATASUS, 2009).

Observando os dados referentes às médias nacionais e do Distrito Federal notam-se elevados gastos com internações de pacientes asmáticos. Embora o tempo médio por internação não seja longo (média de 3,2 dias no Brasil e 3,6 dias no DF) o número de internações por asma o é.

O processo asmático é dividido em duas fases: a fase imediata e a fase tardia. A fase imediata é causada principalmente por espasmo do músculo liso brônquico, caracterizando a resposta de broncoconstrição, típica desta doença, ocorre de 15 a 30 minutos após a exposição ao alérgeno e pode persistir por uma hora (Kay, 2005). É dependente da presença de IgE e da liberação de mediadores químicos derivados dos mastócitos, como leucotrienos, prostaglandinas e triptase. A fase tardia, que ocorre em tempo variável após a exposição ao estímulo antigênico, é ocasionada essencialmente por uma resposta inflamatória aguda, que normalmente progride para um estado inflamatório crônico e é responsável pela principal característica da asma, a hiperresponsividade brônquica (O'Byrne, 2000).

A fisiopatologia da asma está relacionada aos mecanismos de ativação, produção e liberação de mediadores químicos endógenos dos mastócitos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, basófilos e plaquetas (IV Diretrizes Brasileira para Manejo da Asma, 2006; Lima e cols., 2002). A grande maioria das citocinas e demais fatores inflamatórios participantes do processo asmático são

regulados pela transcrição do fator nuclear κ B (NF κ B), que são ativados nas células epiteliais das vias aéreas e desempenham uma importante função na amplificação da inflamação (Barnes, 2008).

Os mastócitos são células chave para o início do processo. São recrutados da mucosa pelo *stem-cell factor* (SCF), secretado pelas células epiteliais que agem nos receptores KIT dos mastócitos, iniciando o processo de inflamação. Além disso, a presença de receptores para IgE de alta afinidade (FC ϵ RI) na superfície da membrana dos mastócitos confere a estas células importante papel no desenvolvimento da resposta imediata da asma brônquica, por meio da liberação de autacóides aminados, como a histamina e serotonina e os lipídicos, tais como leucotrienos cisteínicos e prostaglandina D₂ (PGD₂), que atuam sinergicamente no desenvolvimento da broncoconstrição característica da fase imediata do processo asmático (Barnes, 2008). A desgranulação dos mastócitos leva, também, à liberação de citocinas como o fator de necrose tumoral- α (FNT α) e diferentes interleucinas (IL-1, IL-4, IL-5, IL-8 e IL-13), que agem de forma sinérgica na resposta de fase inflamatória tardia da asma (Doherty e Broide, 2007).

Nos asmáticos, há um número elevado de linfócitos Ta2. Eles secretam IL-4 e IL-13, que estimulam a produção de IgE; IL-5, que é responsável pela diferenciação celular dos eosinófilos na medula óssea e IL-9, que atrai e estimula a diferenciação dos mastócitos (Meyer e cols., 2008; Rosenberg e cols., 2007).

A transcrição do fator GATA-3 (*GATA binding protein-3*) é crucial na diferenciação dos linfócitos T virgens em Ta2 e na produção de citocinas características desta via. Tem sido observado que há um maior número de linfócitos GATA-3⁺ nas vias aéreas de pacientes asmáticos quando comparados com indivíduos normais (Meyer e cols., 2008). Após a ligação no receptor do linfócito T (TCR) e no co-receptor (CD28) pela célula apresentadora de antígeno, a molécula GATA-3⁺ é fosforilada, ativada e migra do citoplasma para o núcleo, onde inicia a transcrição gênica. A expressão da molécula GATA-3 é regulada pela STAT-6 (*signal transducer and activator of transcription-6*), que por sua vez é regulada pela IL-4, citocina clássica da via Ta2 (Maneechotesuwan, 2007).

Em indivíduos não asmáticos, a grande maioria dos linfócitos T é do tipo

bet, que regula a via Ta1 e quando fosforilados inibem a ação da via estimulada pela molécula GATA-3. Estudos demonstraram um menor número de linfócitos T-*bet*⁺ nas vias aéreas de pacientes asmáticos. Ratos deficientes de LT-*bet*⁺ apresentaram uma grande expressão de linfócitos T GATA-3⁺ e produção de citocinas do padrão Ta2 (Finotto, 2002).

Outros linfócitos que exercem importante ação na asma são os T regulatórios (Treg). Estes têm importante ação na diminuição da ação dos linfócitos Ta2. Indivíduos com rinite alérgica possuem um menor número de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ quando comparados com indivíduos não atópicos (Barnes, 2008).

Os linfócitos Ta17, recentemente descobertos, têm papéis bem estabelecidos nos processos inflamatórios e de auto-imunidade. Foram encontradas elevadas concentrações de IL-17, secretada pelos Ta17, nas secreções das vias aéreas de pacientes asmáticos. Esta citocina induz a secreção de quimiocinas, como CXCL1 e CXCL8, que amplificam a inflamação neutrofílica na via aérea (Stockinger e Veldhoen, 2007).

As células dendríticas também exercem seu papel na fisiopatologia da asma, uma vez que possuem receptores para histamina, adrenalina e CysLT1. Estudos (Saeki e cols., 2004), *in vitro*, demonstram a presença de ARN mensageiro (ARNm) para os receptores para CysLT1, 5-LO, FLAP e β -actina, e estes receptores estão em maiores números em pacientes atópicos quando comparados com pacientes sadios, principalmente se estimulados com *Dermatophagoides farinae*. Estas células também exibem uma maior tendência para produção de citocinas como IL-10 e IL-5, fato que os autores atribuem a um desvio da resposta para via Ta2, pois a IL-10 é uma citocina inibitória da IL-12, principal responsável para resposta Ta1 e a IL-5 é uma grande ativadora da produção de IgE e quimiotática para eosinófilos, típicos da resposta alérgica.

Uma vez bem estabelecido este padrão de ativação via Ta2, a secreção da IL-5 exerce papel central na expansão, recrutamento e prolongamento no tempo de vida média dos eosinófilos, em resposta ao estímulo antigênico. Células progenitoras CD34⁺IL-5R⁺ dão origem ao processo de transformação em eosinófilo, associada à ação de GM-CSF e IL-13 (Barnes, 2008; Rosenberg e cols., 2007). Uma vez maduros, os eosinófilos migram para circulação. Indivíduos asmáticos secretam elevadas concentrações de IL-5, fato que

explica, em parte, a eosinofilia encontrada nas secreções das vias aéreas dos mesmos. Apesar disso, a IL-5 não é o único fator para maturação dos eosinófilos. Camundongos nocauteados para IL-5 possuem eosinófilos maduros no sangue periférico, embora em menor número (Jacobsen e cols., 2007).

Iniciado o processo inflamatório na asma, células epiteliais secretam eotaxina-1, que atua como quimiotática para eosinófilos. Acredita-se que a eotaxina-1 exerça papel principal no recrutamento dos eosinófilos em pacientes com asma. Alguns polimorfismos nos genes que codificam a eotaxina têm sido associados à eosinofilia periférica em indivíduos asmáticos (Pease, 2006).

Como o processo inflamatório na asma é um *continuum*, a presença de TNF- α aumenta o tempo de vida dos eosinófilos e diminui a apoptose, perpetuando ainda mais a inflamação (Barnes, 2008; Abadoglu e cols., 2005).

Os eosinófilos desempenham papel central neste processo inflamatório, sendo atualmente, o alvo de vários estudos no desenvolvimento de terapias para controle da asma. Estudos recentes demonstraram o potencial que esta célula possui para causar danos celulares e a liberação de vários mediadores químicos (proteínas básicas catiônicas, mediadores de lipídios e espécies reativas de oxigênio) que acabam gerando injúria à mucosa (Matsumoto e cols., 2008). Além disto, estas células são fontes de vários fatores de crescimento como TGF- α , TGF- β , fator de crescimento do fibroblasto (FGF-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), matriz de metaloproteinase (MMP-9), IL-13 e IL-17 (Doherty e Broide, 2007).

Vários modelos experimentais têm demonstrado que a inflamação da via aérea é de responsabilidade dos eosinófilos (Heat e cols., 1997 e Ying e cols., 1997). Lee e colaboradores (2007) demonstraram que polimorfismos do gene do CCR3, que são receptores para quimiocinas causadoras da eosinofilia periférica e na via aérea, e do receptor para IL-5, principal citocina responsável pelo amadurecimento, ativação e prolongamento do tempo de vida dos eosinófilos, ocasionaram eosinofilia, aumento da hiperresponsividade brônquica e da produção de muco. Os achados estão de acordo com Cho e colaboradores (2004) que excluíram o gene responsável pela IL-5 e observaram supressão da eosinofilia periférica e brônquica, diminuição da fibrose peribronquial, do colágeno III e IV e diminuição do TGF- β 1,

demonstrando que os eosinófilos são as principais fontes de TGF- β 1 no pulmão.

Sedgwick e colaboradores (2004) demonstraram que eosinófilos periféricos de indivíduos asmáticos encontravam-se mais ativados do que os de indivíduos controles normais, e sugeriu que esta ativação era devida à maior concentração de neurotoxina derivada do eosinófilos (EDN). Marques (2003) observou que alterações morfológicas dos eosinófilos periféricos (espraiamento, emissão de pseudópodes, emissão de grânulos e presença de vacúolos), pela técnica da aderência à lâmina, relacionavam-se com o grau de ativação destas células e a gravidade da crise asmática. Tem havido grande interesse na procura de marcadores inflamatórios para asma, que possam auxiliar na prática clínica e que permitam o controle mais preciso do tratamento instituído, entretanto, existem poucos trabalhos com crianças asmáticas analisando a relação entre eosinofilia periférica e a gravidade do quadro clínico (Hughes e cols., 2001) e ainda não há consenso na literatura mundial se os eosinófilos periféricos podem refletir, com acurácia, o processo inflamatório subjacente nas vias aéreas.

Os fagócitos também participam da defesa e da inflamação que ocorrem na asma. Os monócitos, macrófagos alveolares e neutrófilos encontram-se entre as células do sistema imunitário inato que são diretamente relacionadas à defesa contra infecções respiratórias (Skerrett, 1994). Quando as defesas locais do pulmão são insuficientes para conter os microorganismos, a resposta inflamatória é iniciada com o recrutamento das células fagocíticas e proteínas do plasma para o sítio da infecção. No processo de fagocitose, as partículas são reconhecidas pela interação com os receptores específicos na superfície dos fagócitos que se ligam às moléculas de superfície da partícula a ser fagocitada. O contato fagócito-partícula resulta em sinalização intracelular, responsável por desencadear uma série de alterações no tráfico de moléculas, rearranjo do citoesqueleto do fagócito, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas pré e pró inflamatórias, produção de quimiocinas, ativação das vias que ocasionam a apoptose das células e produção de moléculas envolvidas na apresentação do antígeno ao sistema imunitário adaptativo (Underhill e Ozinsky, 2002; Franc e cols., 1999).

A fagocitose pode ocorrer pelos receptores que reconhecem padrões

moleculares de patógenos que interagem diretamente com moléculas de superfície do microorganismo, como manose, glucana, galectina-3, sialoadesina e os receptores tipo Toll (TLR) (Sukkar e cols., 2006). Outros receptores para fagocitose são os receptores para opsoninas, como as moléculas do complemento e a fração Fc da imunoglobulina G, que se ligam aos microorganismos e ao mesmo tempo aos seus receptores específicos presentes na superfície dos fagócitos (Linehan e cols., 2000).

Alguns quadros de asma, principalmente na infância, têm sido relatados como decorrentes de infecções do trato respiratório. Outro ponto que merece atenção é que a asma é fator de risco para pneumonias de repetição (Almirall e cols., 1999). Alguns estudos demonstraram que a função dos fagócitos está alterada na asma, tendo sido observada uma menor capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos (Alexis e cols., 2003). Em adultos asmáticos (Alexis e cols., 2003), tem sido sugerido que esta deficiência deve-se a um desequilíbrio das citocinas destes pacientes, particularmente, na ação de IL-10 e dos leucotrienos, pois podem deprimir a fagocitose e a atividade microbica dos monócitos e macrófagos (Gürer e cols., 2003). Marques (2003) estudou a função fagocitária em crianças asmáticas durante a crise de asma e observou depressão na capacidade fagocitária dos neutrófilos e monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e por meio de receptores para opsoninas e sugeriu que estas alterações poderiam contribuir para um maior risco de infecções. Além disso, observou maior produção de ânions superóxido pelos fagócitos, pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT), o que poderia estar contribuindo para agravar a lesão pulmonar nestes indivíduos asmáticos. Foram também demonstrados maior produção de ânions superóxido pelos fagócitos de pessoas asmáticas, com aumento da hiperresponsividade brônquica e da permeabilidade vascular, gerando fatores quimiotáticos e peroxidação dos lipídios de membrana, com a maior produção de CysLT e demais substâncias broncoconstritoras (Aguayo Maldonado e cols., 1989). Marçal e colaboradores (2000) demonstraram que a produção de ânions superóxido pelos granulócitos e monócitos de crianças e adolescentes asmáticos se relacionava com a gravidade da asma. Sendo que, aquelas com sintomas persistentes possuíam maior produção espontânea ou estimulada de ânion superóxido do que os controles sadios ou crianças com asma

intermitente. Estes resultados sugerem que a produção exacerbada deste radical livre pode estar contribuindo para a lesão pulmonar dos pacientes com sintomas frequentes. Foi demonstrado também que a produção de ânions superóxido é ainda maior na vigência de exacerbação da crise (Kato e cols.,1991). Vale ressaltar que estes radicais de oxigênio estimulam a transcrição do fator NF- κ B, de forma inapropriada, perpetuando todo o processo inflamatório da asma.

Os leucotrienos são eicosanóides oriundos da cascata do ácido aracdônico (AA). A etapa chave de sua formação constitui a formação do intermediário hidroperóxido instável, o ácido 5(S)-hidroperóxido-6(E),8(Z)-11(Z),14(Z)-eicosatetraenóico (5-HPETE), pela ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LPO) sobre o ácido aracdônico liberado pelos fosfolipídios de membrana por ação da fosfolipase A₂. A 5-LPO é uma enzima citoplasmática, ativada pelo transporte intracelular de cálcio e adenosina trifosfato (ATP) em direção à membrana citoplasmática, onde se associa a uma proteína ativadora da 5-LPO (FLAP). Uma vez associada à FLAP, a 5-LPO catalisa a oxigenação na posição C-5 do AA, levando a formação do 5-HPETE, que por ação subsequente da enzima LTA₄ sintase, presente nos mastócitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas e monócitos, é biotransformado no leucotrieno A₄. Este é substrato para duas novas enzimas, a LTA₄ hidrolase, que origina o LTB₄ e a glutathione-S-transferase, levando à bioformação do primeiro leucotrieno cisteínico (LTC₄), que por ações sequenciais das enzimas γ -glutamiltanspeptidase e dispeptidase originam os demais CysLT, LTD₄ e LTE₄, respectivamente (Gogate e Katial, 2008; Riccioni e cols., 2007; Lynch e cols.,1999). Os leucotrienos exercem sua ação na asma ao ligarem-se aos seus receptores específicos (CysLT1 e CysLT2) existentes na musculatura lisa dos brônquios e no pulmão e possuem atividade broncoconstritora cem vezes mais potente que a histamina (Lima e cols. 2002) e prostaglandinas (Riccioni e cols., 2007).

Os leucotrienos cisteínicos (CysLT), LTC₄, LTD₄ e LTE₄, outrora conhecidos como componentes da reação lenta da anafilaxia (SRS-A), descobertos em 1938 por Feldberg e Kellaway, e o leucotrieno pró-inflamatório LTB₄ (Lima e cols., 2002) estão implicados na asma por múltiplos mecanismos incluindo: hipersecreção de muco, aumento da permeabilidade microvascular, prejuízo na atividade ciliar, recrutamento de células inflamatórias, edema e

disfunção neuronal (Hakin e cols., 2007; Nagata e Saito, 2003) e maior produção de colágeno (Nomura e cols., 2004). Eosinófilos de pacientes asmáticos produzem mais LTC₄ do que de pacientes saudáveis, e existe uma superexpressão de LTC₄-sintase nas amostras de biópsias brônquicas obtidas de pacientes asmáticos (Reiss e cols., 1998).

Os antileucotrienos são substâncias que agem inibindo a produção ou bloqueando a ação dos leucotrienos, pela inibição enzimática de sua bioformação ou como antagonista de seus receptores, respectivamente. Esta última abordagem representa uma autêntica e moderna inovação na terapia da asma (Meliton e cols., 2007).

O montelucaste (antileucotrieno) é uma droga antagonista do receptor de cistenil-leucotrieno 1 (cysLT1), inibe a cascata inflamatória que ocorre na asma, com diminuição da hiperresponsividade brônquica (Peters, 2003). Possui afinidade duas vezes maior pelo receptor cysLT1 que o ligante natural (LTD₄) (Aharony, 1998). Inibe a secreção de citocinas pelos linfócitos T auxiliares 2 (Ta2), diminui a quimiotaxia dos eosinófilos (Langois e cols., 2006; Hemelaers e cols., 2006), diminui a eosinofilia periférica (Holgate e Peters-Golden, 2003) e a concentração do óxido nítrico (NO) exalado (Sigiura e cols., 2008; Batra e cols., 2007; Sandrini e cols., 2003). Foi demonstrado que, após duas semanas de tratamento com montelucaste, a capacidade de fagocitose e de destruição intracelular de *C. albicans* pelo polimorfonucleares aumentou significativamente em pacientes asmáticos (Gürer e cols., 2003). Entretanto, falta ainda um maior esclarecimento da influência dos antileucotrienos sobre as funções fagocitárias dos neutrófilos e monócitos, como também da capacidade de produção de radicais do oxigênio pelos fagócitos das crianças asmáticas no período intercrise.

Quanto a influência do montelucaste sobre a eosinofilia no processo inflamatório, foi demonstrado que este antileucotrieno age como agonista inverso, reduzindo o nível intracelular de fosfatidil-inositol trifosfato e diminuindo o influxo celular de cálcio, que é fundamental para várias funções dos eosinófilos, dentre elas a capacidade de migração destas células (Langois e cols., 2006), levando a uma redução de 50 a 60% dos eosinófilos nas secreções de vias aéreas (Hemelaers e cols., 2005).

Também foi demonstrado que o tratamento de cobaias com montelucaste foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 e diminuir a expressão do NF- κ B, fator crítico na transcrição de genes pró-inflamatórios, nos tecidos brônquicos (Wu e cols., 2006). Entretanto, ainda não está esclarecida a influência do montelucaste nos parâmetros morfológicos dos eosinófilos periféricos e sua correlação com a gravidade da doença em crianças, cujo manejo clínico da asma tem sido baseado principalmente nos parâmetros clínicos, o que na maioria das vezes não reflete o potencial inflamatório das vias aéreas, ocasionando uso excessivo ou reduzido de medicamentos e o inadequado controle da doença. Allen (2004) relatou que frequentemente usa-se dose mais elevada de corticóide inalatório do que o necessário no tratamento de crianças asmáticas.

As técnicas atualmente disponíveis para avaliar, direta ou indiretamente, os marcadores biológicos do processo inflamatório na asma e a eficácia terapêutica dos medicamentos utilizados são: dosagem urinária de LTE₄, análise celular do lavado bronquioalveolar, medida do NO exalado (Gogate e Katial, 2008; Malerba e cols., 2008; Zacharasiewicz e cols., 2006), presença de eosinofilia no escarro induzido (Jayaram e cols., 2005) e biópsia pulmonar (Salvato, 2001). Estas técnicas são invasivas, dispendiosas e apresentam dificuldade de realização em crianças menores (Sampson e cols., 2003).

Na infância, o manejo do paciente asmático fundamenta-se nos sintomas clínicos e na função pulmonar, que podem apresentar resultados equivocados, já que a percepção dos sintomas e sua correlação com a função pulmonar são variáveis. Nestas circunstâncias impõe-se a necessidade do uso de marcadores de inflamação na avaliação e acompanhamento do paciente asmático.

O entendimento dos efeitos do montelucaste sobre o estado de ativação dos eosinófilos e função dos fagócitos poderá contribuir com parâmetros objetivos para avaliação da eficácia terapêutica do montelucaste e para um melhor acompanhamento clínico e terapêutico destes pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a influência do tratamento de manutenção com montelucaste, por 12 semanas, em crianças e adolescentes portadores de asma persistente, iniciado em período fora da crise, sobre o estado de ativação dos eosinófilos e sobre as funções dos fagócitos.

Objetivos específicos

1. Avaliar a influência do tratamento de manutenção com montelucaste por 12 semanas sobre o estado de ativação dos eosinófilos em crianças e adolescentes portadores de asma persistente.
2. Avaliar a influência do tratamento com montelucaste por 12 semanas sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos em crianças e adolescentes portadores de asma persistente.
3. Avaliar a influência do tratamento com montelucaste por 12 semanas sobre a produção de ânions superóxido por fagócitos de crianças e adolescentes portadores de asma persistente.

Objetivos secundários

1. Avaliar a influência do tratamento com montelucaste, por 12 semanas, de crianças e adolescentes portadores de asma persistente sobre os parâmetros clínicos da doença e sobre o pico de fluxo expiratório.
2. Avaliar a influência do montelucaste, por 12 semanas de tratamento, sobre a porcentagem de eosinófilos no sangue periférico em indivíduos portadores de asma persistente, no período intercrítico.

INDIVÍDUOS, MATERIAL E MÉTODOS

1. DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS

Tratou-se de um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, no qual foram avaliados o estado de ativação dos eosinófilos e a função dos fagócitos em crianças asmáticas tratadas com montelucaste por um período de 12 semanas e controles saudáveis. O estado de ativação dos eosinófilos foi analisado por parâmetros morfológicos após aderência da célula à lâmina. A capacidade fagocitária dos neutrófilos e monócitos foi avaliada pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e por receptores para opsoninas e a capacidade dos fagócitos produzirem ânions superóxido foi avaliada pelo teste do *nitroblue tetrazolium*.

Os diagramas do estudo encontram-se descritos nas **Figuras 1, 2 e 3**.

Seleção dos voluntários Critérios de inclusão/exclusão

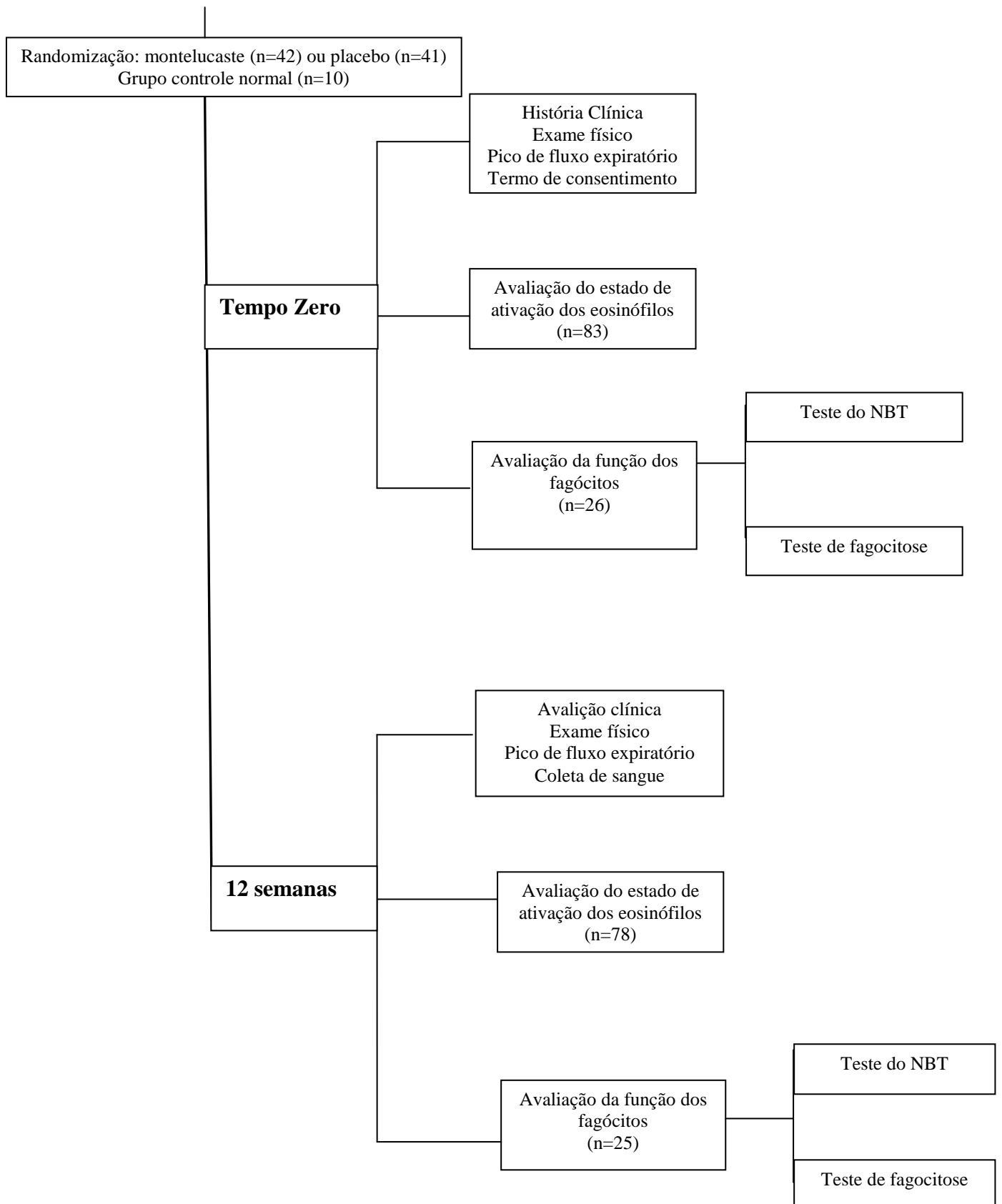


Figura 1: Diagrama geral do estudo.

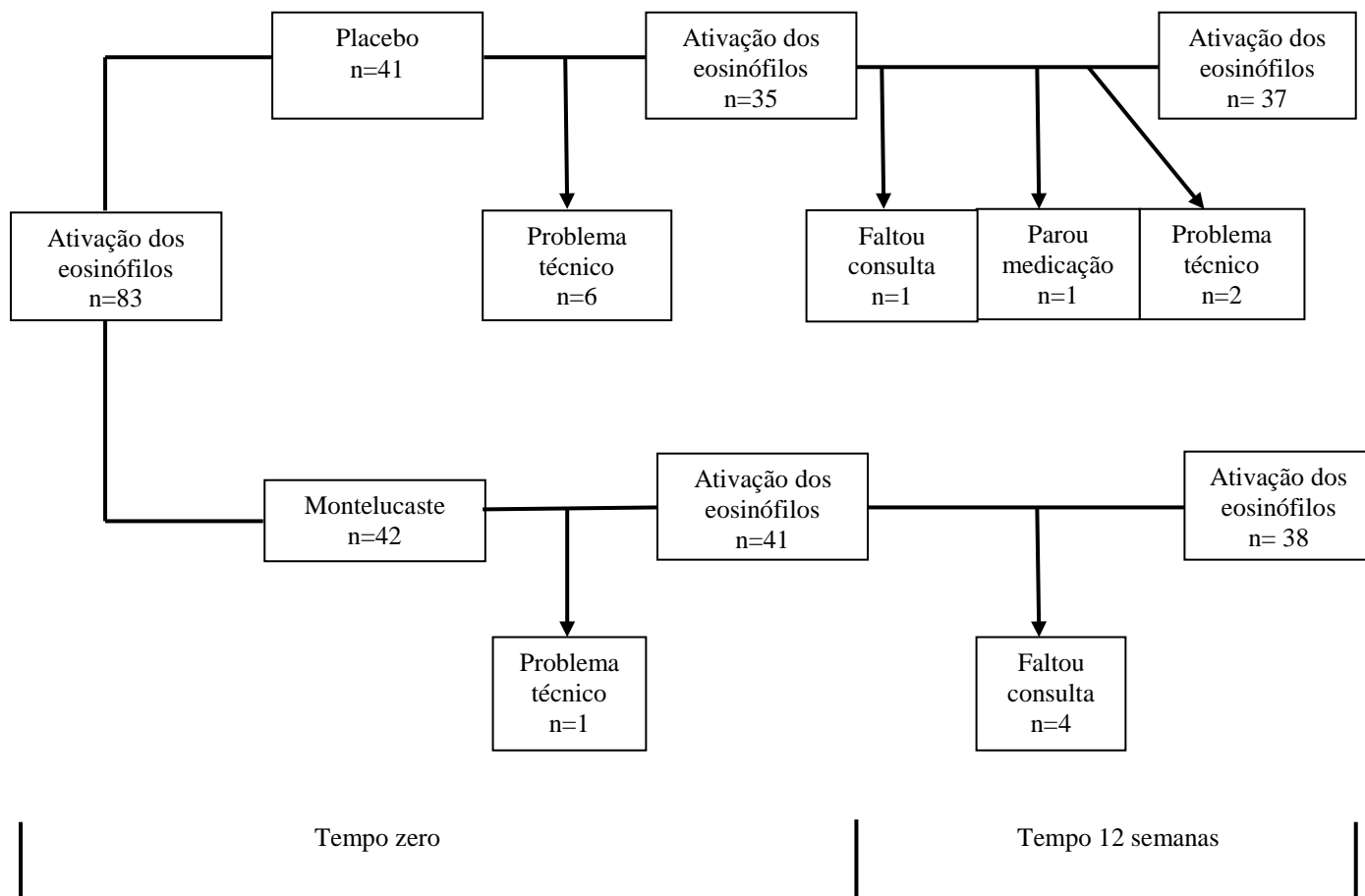
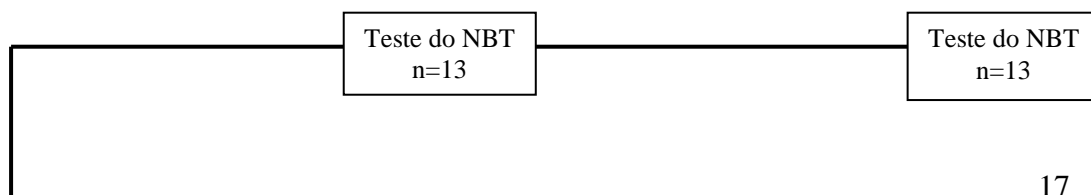


Figura 02: Algoritmo da perda dos indivíduos asmáticos que realizaram o teste de aderência à lâmina para avaliação morfológica dos eosinófilos após o início do tratamento com montelucaste ou placebo. As setas indicam os indivíduos ou lâminas excluídas do projeto. Problema técnico foi definido como a não aderência das células à lâmina ou dificuldade na leitura da mesma.



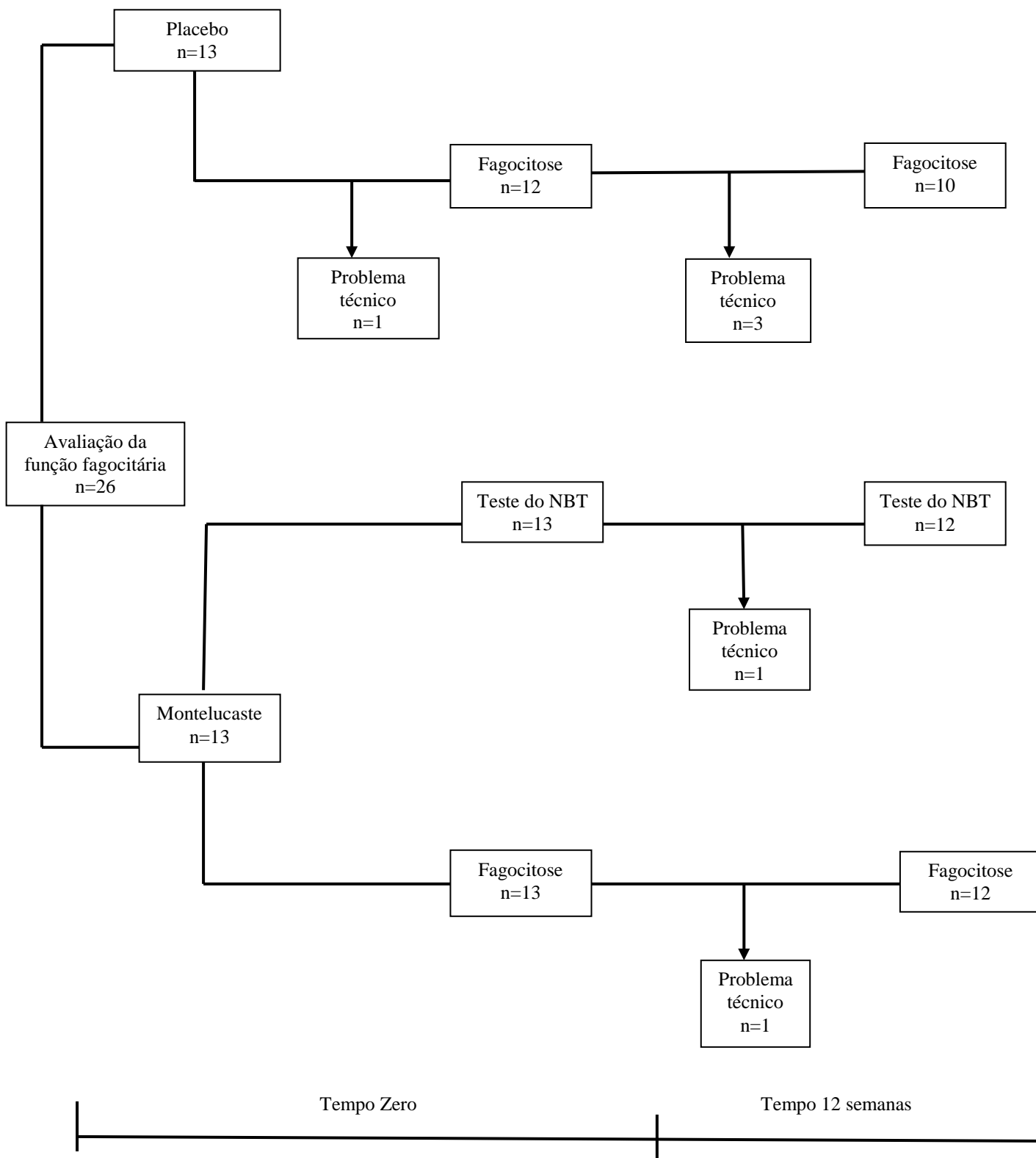


Figura 03: Algoritmo da perda dos indivíduos asmáticos que realizaram avaliação da função fagocitária após o início do tratamento com montelucaste ou placebo. As setas indicam exclusão do projeto. Problema técnico foi definido como a não aderência das células à lâmina ou dificuldade na leitura da mesma.

2. GRUPOS DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS

As normas éticas para pesquisa científica em seres humanos, estabelecidas pela Declaração de Helsinki (WHO, 2008) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro (MS, 1996) foram rigorosamente observadas durante todo o desenvolvimento do presente trabalho. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal (**Anexos 1 e 2**). O projeto encontra-se dentro do grupo de risco mínimo, tendo sido realizada a coleta de 1 a 10 ml de sangue de cada indivíduo por punção venosa periférica, com material estéril e descartável, após o termo de consentimento livre e após esclarecimento escrito (**Anexo 3**) ter sido assinado pelos pais ou responsáveis.

O desenho experimental do trabalho e sua condução deveram-se exclusivamente aos autores que não apresentam nenhum conflito de interesse.

Foram estudados três grupos de crianças e adolescentes com idade de dois a dezoito anos, de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Base do Distrito Federal. Destes, foi coletado sangue para avaliação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos e função fagocitária, que se realizou no Laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Os grupos estudados foram assim distribuídos:

Grupo 1 (n=42): Crianças e adolescentes asmáticos que iniciaram tratamento com montelucaste;

Grupo 2 (n=41): Crianças e adolescentes asmáticos que utilizaram placebo

Grupo 3 (n=10): Crianças e adolescentes saudáveis.

A alocação para cada grupo dos indivíduos que receberam montelucaste ou placebo foi aleatória, sendo a alocação cega para a pesquisadora e para o paciente e seus pais ou responsáveis. A identificação dos grupos foi feita apenas ao final do projeto.

Todas as crianças foram definidas como portadoras de asma segundo IV Diretrizes para Manejo da Asma (2006) e Global Initiative for Asthma (GINA, 2008), que incluíram presença de um ou mais sintomas como dispnéia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito e desconforto torácico, particularmente à

noite ou nas primeiras horas da manhã; sintomas episódicos e melhora espontânea ou pelo uso de medicações específicas para asma (broncodilatadores, antiinflamatórios esteróides). Foram estudadas crianças apenas acima de 2 anos de idade para facilitar a definição diagnóstica de asma.

2.1. Avaliação clínica inicial dos indivíduos

Crianças e adolescentes asmáticos atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia que preenchiam os critérios de diagnóstico para asma e para o início do tratamento com montelucaste eram avaliados por um Protocolo Clínico de Pesquisa (**Anexo 4**) que incluía: a) dados de identificação; b) formas clínicas associadas e seu respectivo tratamento: rinite alérgica, conjuntivite alérgica e dermatite atópica; c) classificação inicial da gravidade da asma segundo a IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma (2006); d) nível de controle do paciente com asma segundo a IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma (2006); e) dados da doença: tempo de doença, número de crises asmáticas, atendimento na emergência, internações e faltas escolares ocorridas no último ano, além da percepção dos pais ou responsáveis sobre o grau de interferência da asma no dia a dia da criança; f) uso de medicações profiláticas.

Após o preenchimento deste protocolo, era realizado o exame físico com ênfase na ausculta pulmonar e pico de fluxo expiratório (PFE) para aquelas crianças com capacidade de realizar expiração forçada após inspiração máxima, crianças maiores que 5 anos ou 100 cm de altura (Godfrey e cols., 1970).

Com fins de propiciar a análise de correlação estatística entre a gravidade da doença com os parâmetros de ativação dos eosinófilos, foi realizada uma pontuação para gravidade, onde se atribui valores de 1 a 4 aos diversos parâmetros clínicos apresentados pelos pacientes segundo a IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma (**Tabela 01**).

Das 83 crianças e adolescentes asmáticos, cinco faltaram à consulta de retorno 12 semanas após o início de tratamento com montelucaste ou placebo, sendo 4 do grupo montelucaste e uma do grupo placebo.

Nesta etapa, foi preenchido um questionário (Protocolo Clínico de Pesquisa/Anexo 4) para avaliação do grau de controle da doença e da qualidade de vida após o início do montelucaste e realizado o pico de fluxo expiratório (PFE) nas crianças com capacidade técnica para tal.

Para avaliar a melhora da função pulmonar e diminuição do processo inflamatório, o valor do pico de fluxo expiratório obtido após 12 semanas de tratamento com o montelucaste ou placebo foi comparado com os valores obtidos na fase inicial do tratamento.

2.2. Critérios de Inclusão dos pacientes asmáticos

Os critérios de inclusão no estudo foram: a) Crianças acima de dois anos de idade e adolescentes até 18 anos portadores de asma atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Base do Distrito Federal; b) preenchimento dos critérios para o início do montelucaste, segundo a IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma, 2006 e/ou nenhuma contra-indicação para o uso do montelucaste; c) Concordância dos pais ou responsáveis em participar da pesquisa, após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.3. Critérios de Exclusão dos pacientes asmáticos

Os critérios de exclusão do estudo foram os seguintes: pacientes com neoplasias, diabetes, síndromes genéticas, doenças de depósito ou erros inatos do metabolismo, doenças da tireóide, doença celíaca, fibrose cística, doenças auto-imunes (lupus, artrite reumatóide, dermatomiosite, etc), doenças de base renal, cardíaca ou hepática, outras doenças pulmonares (pneumopatias intersticiais, broncodisplasia pulmonar e tuberculose), síndrome da imunodeficiência adquirida, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, doença de Crohn, qualquer outro tipo de doença que potencialmente pudesse alterar as funções do sistema imunitário, contra-indicação para o uso de montelucaste e não concordância dos pais ou responsáveis em participar da pesquisa.

2.4. Contra-indicações gerais para o dia da primeira coleta de sangue

Após a análise clínica e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, as crianças eram encaminhadas para a coleta de sangue. As contra-indicações gerais para o dia da coleta foram as seguintes: a) processo infeccioso agudo febril, b) vigência de crise asmática, c) uso de corticóide oral nos últimos quinze dias, d) uso de hemoderivados nos últimos trinta dias, e) vacinação nos últimos quinze dias.

2.5. Critérios para início do montelucaste e randomização dos pacientes

Após a coleta de sangue, todas as crianças iniciavam tratamento com montelucaste ou placebo seguindo um processo de randomização estratificada em bloco. Os comprimidos eram armazenados em temperatura ambiente, em frascos contendo gel de sílica que apenas se diferenciavam pela cor da tampa (azul ou vermelha). Os comprimidos placebos eram indistinguíveis do comprimido do montelucaste, possuindo a mesma forma, cor e sabor do comprimido original e foram produzidos no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Goiânia.

Todas as crianças e adolescentes com asma persistente, que já faziam uso de corticóide inalatório e/ou agente beta-2 agonista de longa ação, porém apresentavam asma parcialmente ou totalmente não controlada ou portadores da asma induzida pelo exercício eram indicados para iniciar o medicamento.

As crianças de dois a cinco anos fizeram uso do comprimido de montelucaste de 4mg, de seis anos a 15 anos utilizaram o comprimido de montelucaste de 5mg e após os 15 anos, a dosagem era 10mg, segundo recomendações do laboratório fabricante (Singulair®, Merck Sharp & Dohme). Os comprimidos de 4mg e 10mg foram gentilmente cedidos pelo Programa de Atendimento ao Paciente Asmático da Secretaria de Saúde do Distrito Federal e os comprimidos de 5mg foram gentilmente cedidos pela Merck Sharp & Dohme.

2.6. Avaliação clínica pós-tratamento

Após 12 semanas de tratamento (Reiss e cols., 1998) com montelucaste ou placebo, os pacientes retornavam para uma segunda avaliação clínica que incluía o exame clínico geral com ênfase à ausculta pulmonar, a determinação do pico de fluxo expiratório e um questionamento sobre o número de crises, necessidade de procurar consulta médica em pronto socorro, internações e faltas escolares desde a última consulta. Os pais ou responsáveis ainda eram solicitados a emitir sua opinião acerca da gravidade da asma naquele momento, classificavam a asma como leve, moderada ou grave e davam uma nota para o percentual de melhora que eles consideravam, caso houvesse ocorrido.

Após o exame clínico, os pacientes eram classificados segundo estado de gravidade e nível de controle da asma segundo as normas da IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma-2006.

Após a segunda coleta de sangue, todos os pacientes passaram para o tratamento com o montelucaste, independentemente de ter havido melhora ou não, devido à possibilidade de ter feito uso de placebo.

2.7. Crianças e adolescentes sadios

Para comparação do estado de ativação dos eosinófilos e da função fagocitária dos neutrófilos e monócitos com os valores normais foram estudadas dez crianças não alérgicas e que não possuíam história familiar para doenças atópicas. Estas foram selecionadas nos ambulatórios de Pediatria Geral da Secretaria de Saúde do Distrito Federal e encaminhadas para a coleta de 2-10 ml de sangue no laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Antes da coleta, era explicada a finalidade da pesquisa e preenchido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para crianças sadias (**Anexo 5**). As mesmas contra-indicações para o dia da coleta dos pacientes asmáticos foram utilizadas para o grupo controle.

Tabela 01: Padronização da pontuação correspondente aos parâmetros de gravidade na classificação da asma.

PARÂMETROS	INTERMITENTE	PERSISTENTE LEVE	PERSISTENTE MODERADA	PERSISTENTE GRAVE
Sintomas diurnos	Raros 1	Semanais 2	Diários 3	Diários ou contínuos 4
Despertar noturno	Raros 1	Mensais 2	Semanais 3	Quase diários 4
Boncodilatador para alívio	Raramente 1	Eventual 2	Diária 3	Diária 4
Limitação atividades	Nenhuma 1	Presente nas exacerbações 2	Presente nas exacerbações 3	Contínua 4
Exacerbações	Raras 1	Afeta atividades e Sono 2	Afeta atividades e Sono 3	Freqüentes 4
VEF ₁ ou PFE	≥80% predito 1	≥80% predito 2	60-80% predito 3	≤60% predito 4

VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; PFE: Pico de fluxo expiratório.

Adaptado da IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma (2006).

3. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MONTELUCASTE SOBRE O ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES ASMÁTICOS, POR PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

Para avaliar a influência do montelukaste sobre o estado de ativação dos eosinófilos, foram estudadas 83 crianças asmáticas acompanhadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Base do Distrito Federal, randomizadas nos grupos tratados com montelukaste (n=42) ou placebo (n=41). O perfil destes pacientes encontra-se no **Anexo 6** e **Anexo 7**, respectivamente. Para o grupo controle (**Anexo 8**) foram estudadas 10 crianças saudáveis. Em todas foram caracterizados os aspectos morfológicos dos eosinófilos obtidos pela aderência à lâmina de microscopia.

Foi coletado de 1 a 5ml de sangue venoso periférico de todas as crianças e adolescentes estudados, dos quais foram distribuídos em escavações previamente delimitadas em áreas de 7mm de diâmetro marcadas com epóxi em lâminas de microscopia.

As preparações foram incubadas em câmara úmida a 37°C, por 45 minutos, para permitir a aderência dos fagócitos à lâmina. Em seguida, as células não aderentes (eritrócitos, plaquetas e linfócitos) foram retiradas por lavagem com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2, a 37°C. A

monocamada de células aderentes (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) foi fixada com metanol por 2 minutos e corada com Giemsa a 10% em tampão para coloração pH 6,8, pois neste pH os eosinófilos ficam mais bem caracterizados, com grânulos de coloração alaranjada (Marques, 2003).

A proporção relativa entre eosinófilos, neutrófilos e monócitos aderidos à lâmina foi determinada em 100 células por preparação.

O estado de ativação dos eosinófilos foi avaliado por parâmetros morfológicos em 200 eosinófilos por preparação. A análise foi feita ao microscópio óptico quantificando-se as seguintes alterações: espraiamento, arredondamento, emissão de grânulos (leve, moderada e acentuada quantidade), presença de vacúolos, presença de pseudópodes (localizados e generalizados), presença de grânulos isolados, aspectos de degeneração celular e contato entre eosinófilos e outras células (Marques, 2003).

4. INFLUÊNCIA DO MONTELUCASTE SOBRE A CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES ASMÁTICOS PELOS RECEPTORES QUE RECONHECEM PADRÕES MOLECULARES DE PATÓGENOS

Para avaliar a influência do montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos de crianças e adolescentes asmáticos e controles pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, o teste de fagocitose foi realizado em 26 indivíduos asmáticos, sendo 13 alocados aleatoriamente no grupo montelucaste e 13 no grupo placebo e 10 controles saudáveis, por técnica previamente descrita (Muniz-Junqueira e cols., 2003).

Do sangue obtido por punção venosa, 40 μ l eram distribuídos por áreas de 7mm de diâmetro delimitadas com epóxi em lâminas de microscopia e incubadas a 37°C, em câmara úmida, por 45 minutos, para permitir a aderência dos fagócitos à lâmina. Após este período, as lâminas eram lavadas com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2, a 37°C, para retirar as células não aderentes (eritrócitos, plaquetas e linfócitos). As células aderidas (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) eram incubadas por 30 minutos, em estufa a 37°C, com uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*, em Hanks-

triz (Gibco), suplementada com soro fetal bovino a 10%, na proporção de 20 leveduras por fagócito para permitir a fagocitose. Em seguida as preparações eram lavadas com STF, pH 7,2, para retirar as leveduras não fagocitadas, sendo que a última lavagem era realizada com Hanks-triz (Gibco) com soro fetal bovino a 30% para melhor preservar as preparações.

As lâminas eram secas com vento quente, fixadas em metanol por um minuto e coradas com Giemsa a 10% em tampão para coloração, pH 7,2 por 10 minutos.

Os fagócitos eram analisados no microscópio óptico com objetiva de imersão, sendo contados 200 monócitos e 200 neutrófilos por preparação, para determinar o índice fagocitário.

O índice fagocitário era determinado pela multiplicação da média do número de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ingeridas/aderidas por fagócito pela proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose (Muniz-Junqueira e cols., 2001). A análise foi individualizada para os neutrófilos e monócitos em cada preparação.

Índice fagocitário= média de leveduras/fagócito x proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose

4.1. Preparação da suspensão estoque de leveduras para o teste de fagocitose

A suspensão estoque de leveduras foi preparada segundo a técnica descrita por Lachmann e Hobart (1997). Por esta técnica de preparação há uma modificação da superfície da levedura, a qual facilita a adsorção do componente C3 do complemento. Brandi (1993) também demonstrou por imunofluorescência que os anticorpos presentes no soro podem adsorver-se na superfície da levedura.

Para a preparação da levedura, 50g de fermento fresco para pão (Fleischmann) foram dissolvidos em 220ml de solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2 e autoclavados a 120°C, em uma atmosfera, por trinta minutos.

Em seguida, a suspensão foi lavada com STF até obter-se um sobrenadante límpido.

O sedimento foi suspenso em 28ml de STF contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol e incubado, a 37°C, por duas horas, em agitação.

Após, foi lavado três vezes por centrifugação para retirada do 2-mercaptoetanol e suspenso em 55ml de solução a 0,02M de iodo acetamida em STF. Nova incubação por 2 horas foi feita, à temperatura ambiente, com agitação e, em seguida, as leveduras foram lavadas três vezes por centrifugação em STF, suspensas em 220ml de STF e o pH foi ajustado para 7,2.

A preparação foi autoclavada, novamente, a 120°C, por 30 minutos, lavada em STF por centrifugação e suspensa em 110ml de tampão veronal pH 7,2, contendo azida sódica (200mg/ml), como preservativo.

Após esta preparação, as leveduras foram mantidas a 4°C e obtidas do estoque para utilização em cada experimento.

4.2. Preparação da suspensão de leveduras para utilização no teste de fagocitose

Em cada experimento, um alíquota de ~~25~~ era retirada da suspensão estoque de leveduras, o volume era completado para 1ml com STF e a suspensão lavada três vezes por centrifugação em STF, pH 7,2.

Após, eram suspensas novamente para 50 μ l com STF e as leveduras eram quantificadas em câmara de Neubauer. Eram, em seguida, incubadas com soro fetal bovino a 10%, previamente inativado a 56°C, por 30 minutos, em RPMI 1640 (Gibco) em banho-Maria, a 37°C por 30 minutos.

5. INFLUÊNCIA DO MONTELUCASTE SOBRE A CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES ASMÁTICOS PELOS RECEPTORES PARA OPSONINAS.

Nesta etapa foram estudadas 26 crianças asmáticas (placebo n=13 e montelukaste (n=13) e 10 controles sadios.

O soro fresco contém frações do complemento, particularmente o componente C3, que quando incubados com leveduras a 37°C, adsorvem-se à sua superfície. Como os monócitos e neutrófilos possuem receptores para a fração C3 do complemento, essa fração adsorvida à levedura funciona como uma opsonina, ou seja, liga-se à levedura por um lado e ao fagócito por outro, facilitando a fagocitose.

Com objetivo de testar a fagocitose por meio de receptores dos fagócitos para componentes do sistema complemento e fração Fc da imunoglobulina G (IgG), o teste da fagocitose foi realizado como acima descrito (item 4), substituindo-se o soro fetal bovino inativado pelo soro fresco do próprio indivíduo doador para sensibilização das leveduras.

5.1. Sensibilização das leveduras com componentes do complemento e anticorpos

As leveduras utilizadas nos experimentos de fagocitose facilitada por opsoninas foram sensibilizadas pela incubação a 37°C, por 30 minutos, em banho-Maria com o soro fresco a 10% do mesmo indivíduo para qual os fagócitos estavam sendo testados.

6. INFLUÊNCIA DO MONTELUCASTE SOBRE A PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO PELOS FAGÓCITOS DE CRIANÇAS ASMÁTICAS, PELO TESTE DO *NITROBLUE TETRAZOLIUM* (NBT)

Com o objetivo de avaliar a influência do montelukaste sobre a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos de pacientes asmáticos e controles foi

feito do teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT) em 26 crianças asmáticas (placebo n=13 e montelucaste n=13) e 10 crianças saudáveis.

O teste do NBT detecta de maneira indireta a produção de ânions superóxido (O_2^-) (Nydegger, 1973). O NBT é um receptor de elétrons e o processo de redução converte o NBT de um componente amarelo e solúvel para um material insolúvel, de cor azul que precipita no citoplasma da célula, pode ser visualizado por microscopia óptica e quantificado pelo número de células apresentando o corante no citoplasma. Esta proporção mostra relação quantitativa com a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos (Campbell e Douglas, 1997).

Para realização do teste do NBT basal, os fagócitos aderidos à lâmina, como previamente descrito para o teste de fagocitose (item 4), eram incubados por 20 minutos com 20µl de NBT a 0,05% em Hanks-triz, em câmara úmida, a 37°C. Em seguida, as preparações eram lavadas com STF, sendo a última lavagem realizada com Hanks-triz com SFB a 30%.

Após, as lâminas eram secas com vento quente, fixadas com metanol por um minuto e contra coradas com safranina a 1,4% por cinco minutos. A contra-coloração das preparações com safranina era realizada para possibilitar a visualização dos núcleos dos fagócitos.

Para analisar a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos estimulados, foi realizado o mesmo teste acima descrito, incubando-se os fagócitos com NBT e com $6,25 \times 10^4$ leveduras sensibilizadas por preparação. Após coloração, as lâminas eram analisadas por microscopia óptica, com aumento de 1000x, para quantificação da porcentagem de fagócitos que reduziram o NBT na presença de leveduras.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises e os gráficos foram feitos empregando-se o programa Prism® 5 para Windows (GraphPad, USA, 2007) e SigmaStat 3.11/SigmaPlot 9.01 para Windows.

Previamente aos experimentos foi feito o teste para determinação do tamanho da amostra para obter resultados estatísticos confiáveis utilizando o

programa estatístico SigmaStat 3.11/SigmaPlot 9.01 para Windows, sendo determinado que seria suficiente um n de 20 indivíduos, considerando como parâmetros uma diferença entre as médias de 20, o desvio padrão da amostra de 20, o poder do teste 0,8-0,9 e o valor do $p < 0,05$.

Para a aplicação dos testes estatísticos verificou-se previamente a normalidade ou não das variáveis das amostras. A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste t pareado ou o de Mann-Whitney. Os testes estatísticos empregados para a comparação entre mais do que 2 grupos foram o ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido pelos métodos de Student-Newman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações entre os grupos, respectivamente, segundo a normalidade das amostras.

Para comparação entre proporções foram utilizados os teste do qui-quadrado ou de Fisher.

Para avaliar as correlações entre os dados foram utilizados o teste de correlação de Pearson para amostras com distribuição normal e o teste de correlação de Spearman para amostras com distribuição não normal.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos, graficamente, como mediana, quartis e extremos.

RESULTADOS

1. ACHADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES ASMÁTICOS E CONTROLES

1.1. Fase pré-tratamento

Com o objetivo de avaliar a homogeneidade dos grupos que foram tratados com montelucaste ou placebo no início da alocação aleatória foram comparados os parâmetros clínicos e laboratoriais dos dois grupos.

Foram incluídas na pesquisa 83 crianças e adolescentes asmáticos, com idades que variaram de 3 a 18 anos, com média±DP de 7 anos e 7 meses±3 anos e 7 meses, sendo 47 (57%) meninos e 36 (43%) meninas. Para o grupo tratado com montelucaste foram alocadas aleatoriamente 42 crianças, sendo 23 (55%) do sexo masculino e 19 (45%) do sexo feminino. A idade variou de 3 a 18 anos, com média±DP de idade de 7 anos e 6 meses±3 anos e 9 meses. Para o grupo que utilizou placebo foram alocadas 41 crianças, sendo 24 (58%) do sexo masculino e 17 (42%) do sexo feminino, as idades variaram de 3 a 15 anos, com média±DP de idade de 7 anos e 7 meses±3 anos e 5 meses. Não houve diferença estatística entre os dois grupos em relação ao sexo ($p=0,7$; Teste Qui-quadrado) e idade ($p=0,9$; Mann-Whitney).

No grupo controle foram incluídas 10 crianças saudáveis. A idade variou de 5 a 12 anos, com média±DP de idade de 8 anos e 2 meses±2 anos e 5 meses. Não houve diferença estatística entre as idades dos grupos controle, montelucaste e placebo ($p=0,77$, teste de Kruskal-Wallis).

A média do Z-score do índice de massa corporal (IMC) para o grupo montelucaste foi $0,86\pm 1,35$ e para o grupo placebo $0,37\pm 1,11$. Não houve diferença estatística no IMC entre os grupos ($p= 0,09$, Mann-Whitney). Uma criança do grupo montelucaste apresentou o Z-score menor que -2,0, indicando desnutrição e duas apresentaram o Z-score maior que 2,0, indicando obesidade.

Não houve diferença entre os parâmetros hematológicos dos pacientes asmáticos na fase inicial de tratamento dos grupos tratados com montelucaste ou placebo. Observou-se no grupo que iniciou montelucaste que o valor médio de hemoglobina foi de $12,89\pm 1,08$ g/dl e no grupo placebo, o valor médio da hemoglobina foi de $13,26\pm 1,44$ g/dl ($p=0,31$; teste t). Nenhum paciente apresentava anemia na fase inicial do tratamento.

Pela análise dos leucócitos, observou-se no grupo tratado com montelucaste que os valores variaram de 6740 céls/mm³ a 13400 céls/mm³, com média±DP de 9546±1968 céls/mm³. No grupo placebo, os valores variaram de 4820 céls/mm³ a 13900 céls/mm³, com média±DP de 9127±2726 céls/mm³, não havendo diferença estatística entre os grupos (p=0,54; teste t).

A média do número de eosinófilos no sangue periférico encontrava-se elevada para ambos os grupos (montelucaste= 513,5 eosinófilos e placebo = 595,8 eosinófilos), sem diferença estatística entre os dois grupos na fase inicial do tratamento (p=0,54; teste t). Houve correlação entre o número de eosinófilos dos pacientes asmáticos quantificados no sangue periférico e os aderidos na lâmina (p=0,03, r²= 0,78).

Das crianças incluídas no projeto, cinco faltaram à segunda fase da consulta, sendo 4 crianças do grupo montelucaste e uma do grupo placebo.

Das crianças e adolescentes incluídas no grupo montelucaste e placebo, 13 de cada grupo fizeram uso do comprimido mastigável de 4mg, 27 do comprimido de 5mg e dois adolescentes do grupo montelucaste utilizaram o comprimido de 10mg e um do grupo placebo fez uso do comprimido placebo correspondente ao de 10mg.

Dentre as crianças tratadas com montelucaste, observou-se a presença de outras morbidades alérgicas, que foram: 36 (86%) apresentavam rinite alérgica associada; quatro (9,5%) apresentavam dermatite atópica, seis (14,2%) pacientes tinham conjuntivite alérgica e seis (14,2%) pacientes não apresentavam outras co-morbidades alérgicas associadas à asma. No grupo placebo, 83% (34) apresentavam rinite alérgica; quatro (9,7%) pacientes apresentavam dermatite atópica, sete (17%) pacientes apresentavam conjuntivite alérgica e sete (17%) pacientes não apresentavam nenhuma doença atópica associada.

A distribuição dos pacientes foi feita segundo a IV Diretrizes para o Manejo da Asma (2006), sendo o nível de gravidade da asma classificado em: intermitente, persistente leve, persistente moderada, persistente grave e asma induzida por exercício (AIE), tanto com a crise somente aos esforços (Kemp, 2009) ou associada à asma persistente sem controle clínico. Um paciente apresentou asma intermitente, porém devido o prolongado tempo de duração

das crises asmáticas foi optado pelo início do montelucaste e cinco pacientes apresentaram somente AIE (**Tabela 2**).

Tabela 2: Distribuição dos indivíduos, segundo o nível de gravidade clínica, para os grupos montelucaste e placebo.

Nível de Gravidade *	Montelucaste	Placebo	Teste estatístico
Asma Intermitente	1 (2,4%)	0 (0%)	Teste exato de Fischer >0,05
Asma Persistente Leve	6 (14,2%)	9 (22%)	Qui-quadrado p= 0,45
Asma Persistente Moderada	16 (38%)	18 (44%)	
Asma Persistente Grave	11 (26,2%)	7 (17,1%)	
Asma Persistente leve + AIE	1 (2,4%)	2 (4,8%)	Teste exato de Fischer >0,05
Asma Persistente Moderada + AIE	4 (9,6%)	1 (2,4%)	
Asma Persistente Grave + AIE	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
AIE somente	2 (4,8%)	3 (7,3%)	

* Definição da forma clínica baseada nos parâmetros da IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma (2006).

O escore de gravidade dos 42 pacientes que iniciaram tratamento com montelucaste variou de 5 a 24 pontos, com média de 14,2±4,5 pontos. No grupo placebo foram incluídos 41 pacientes com o escore de gravidade variando de 10 a 21 pontos, média de 14±2,96 pontos. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com montelucaste ou placebo pelo o escore de gravidade (p=0,99; Mann-Whitney).

Todos os pacientes preenchem os critérios brasileiros das sociedades de pediatria e pneumologia para associação do montelucaste à terapêutica medicamentosa. Sendo que no grupo que iniciou montelucaste, 52,4% possuíam asma parcialmente controlada e 47,6%, asma não controlada, e naqueles que usaram o placebo, em 58,5% a asma era parcialmente controlada e em 41,5% a asma era não controlada (IV Diretrizes para o Manejo da Asma; 2006).

Com relação ao tempo de doença, número de crises no último ano, atendimentos no pronto-socorro no último ano, faltas escolares no último ano e a percepção dos pais ou responsáveis sobre a interferência da asma no dia-a-dia dos indivíduos alocados para tratamento com montelucaste ou placebo, os resultados encontram-se na **Tabela 3**.

Tabela 3. Distribuição dos indivíduos segundo os parâmetros clínicos da asma das crianças e adolescentes dos grupos montelucaste e placebo. Valores expressos em números absolutos de pacientes e porcentagem.

Dados clínicos		Montelucaste (N=42) n (%)	Placebo (N=41) n (%)	Teste estatístico
Tempo de doença	< 1 ano	1 (2,4 %)	3 (7,3%)	Qui- quadrado p= 0,70
	1 a 5 anos	19 (45,3 %)	16 (39%)	
	6 a 10 anos	18 (42,8%)	17 (41,5%)	
	>10 anos	4 (9,5%)	5 (12,2%)	
Número de Crises no último ano	0 a 3 crises	9 (21,5%)	6 (14,6%)	Qui- quadrado p= 0,19
	4 a 7 crises	19 (45,3%)	12 (29,3%)	
	8 a 11 crises	7 (16,6%)	14 (34,1%)	
	>11 crises	7 (16,6%)	9 (22%)	
Atendimento no pronto-socorro no último ano	Nenhum	13 (31%)	15 (36,6%)	Qui- quadrado p= 0,91
	1 a 3 atendimentos	14 (33,4%)	12 (29,3%)	
	4 a 7 atendimentos	7 (16,6%)	5 (12,2%)	
	8 a 11 atendimentos	7 (16,6%)	7 (17%)	
	> 11 atendimentos	1 (2,4%)	2 (4,9%)	
Faltas escolares no último ano	Nenhuma	5 (11,9%)	7 (17%)	Qui- quadrado p= 0,87
	1 a 5 faltas/ano	7 (16,6%)	8 (19,6%)	
	6 a 10 faltas/ano	10 (23,9%)	10 (24,5%)	
	11 a 20 faltas/ano	9 (21,5%)	7 (17%)	
	>20 faltas/ano	7 (16,6%)	6 (14,6%)	
	Não freqüente	4 (9,5%)	3 (7,3%)	
A asma interfere no dia-a-dia?	Nada	1 (2,4%)	1 (2,4%)	Qui- quadrado p= 0,99
	Pouco	15 (35,7%)	15 (36,6%)	
	Muito	26 (61,9%)	25 (61%)	

Pela análise do número de internações no último ano entre os indivíduos dos grupos montelucaste ou placebo observou-se que, em ambos os grupos, o número máximo de internações devido crises de asma foi dois e não houve diferença entre os grupos ($p=0,36$; Mann-Whitney).

Com relação à terapia de manutenção realizada pelos indivíduos no início da pesquisa, os dados encontram-se na **Tabela 4**. Por questões éticas, nenhum tratamento de manutenção para asma foi retirado dos indivíduos no início do projeto.

Tabela 4. Distribuição do tipo de tratamento de manutenção realizado pelos indivíduos asmáticos no início da pesquisa. Valores em número absoluto de indivíduos e porcentagem.

Tipos de Tratamento / Grupos	Corticóide inalatório	Corticóide inalatório associado à β -2 de longa ação	Imunoterapia específica	Nenhum	Total	Estatística
Montelucaste	25 (54,4%)	6 (50%)	0	11(45,8%)	42	Qui-quadrado $p=0,92$
Placebo	21 (45,6%)	6 (50%)	1	13 (54,2%)	41	
Total	46 (55,5%)	12 (14,5%)	1 (1%)	24 (29%)	83	

Observação: Para possibilitar a realização da análise estatística foi excluído do teste o grupo que estava recebendo imunoterapia específica.

Onze (26,2%) indivíduos que iniciaram o tratamento com montelucaste não faziam uso de nenhuma medicação profilática até o dia da primeira consulta. Trinta e um pacientes (73,8%) faziam uso de medicação, 81% (25/31) eram medicados com corticóide inalatório (budesonida ou beclometasona) e 19% (6/31) faziam o uso combinado de corticóide inalatório e broncodilatadores de longa ação (**Tabela 04**). Esta distribuição não foi diferente da encontrada no grupo placebo, no qual 32% (13/41) não faziam uso de medicação, 51% (21/41) usavam corticóide inalatório, 14,6% faziam uso da associação de corticóide inalatório e agente β -2 agonista e um (2,4%) paciente fazia uso de imunoterapia para tratamento de rinite alérgica.

Com relação ao pico de fluxo expiratório (PFE), 19 pacientes asmáticos não o realizaram por incapacidade técnica para expiração forçada. A comparação entre os grupos foi realizada baseada no percentual do volume expiratório, tendo como referência os valores mínimos de normalidade para gênero, idade e estatura (Godfrey e cols., 1970). No grupo alocado para o tratamento com montelucaste ($n=32$), a média do PFE foi de $86,8\% \pm 16,9\%$, variando de 48% a 100%. No grupo placebo ($n=32$), a média do PFE foi de $90,4\% \pm 13,6\%$ do valor previsto, variando de 57% a 100%, não havendo diferença estatística entre os dois grupos ($p= 0,34$; Teste de Wilcoxon).

1.2. Fase pós-tratamento

Trinta e oito pacientes do grupo tratado com montelucaste e 40 do grupo placebo retornaram à consulta. O número de exacerbações da asma no período interconsulta variou de nenhuma a três crises para os pacientes

tratados com montelucaste e de até cinco crises para o grupo placebo, porém não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao número de crises ($p=0,18$, Qui-Quadrado). Seis pacientes do grupo montelucaste e 8 do grupo placebo procuraram atendimento de emergência devido as crises serem consideradas fortes pelos pais ou responsáveis. Quanto ao número de internações devidas à asma no período, dois pacientes necessitaram de internação no grupo montelucaste (média de dias internados 1,2/dias) e nenhum paciente do grupo placebo precisou de internação durante o período de 12 semanas de avaliação.

Com relação ao número de faltas escolares, no período de 12 semanas, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos placebo e montelucaste ($p=0,96$, Qui-Quadrado). Quando os pais ou responsáveis foram solicitados a emitir uma nota de zero a dez para o grau de melhora dos seus filhos, a impressão subjetiva de melhora após o início do tratamento com montelucaste foi de 70% (média \pm DP de $7\pm 2,6$) e para os indivíduos do grupo controle foi de 50% (5 ± 2), ($p=0,94$, Qui-Quadrado). Três pacientes do grupo montelucaste e sete do grupo placebo não obtiveram nenhuma melhora pela avaliação dos seus responsáveis.

Com relação ao nível de controle clínico para os pacientes tratados com montelucaste, baseado na IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma (2006), 11 indivíduos (29%) apresentaram controle total das crises, 15 indivíduos (39,5%) apresentaram asma parcialmente controlada e 12 indivíduos (31,5%) não apresentaram controle no período de 12 semanas de tratamento com montelucaste. No grupo de asmáticos que utilizou placebo, 12 (30%) apresentaram controle das crises, 13 (32,5%) controle parcial e 15 (37,5) nenhum controle das crises ($p=0,46$, Qui-Quadrado).

Na avaliação do controle da asma induzida pelo exercício (AIE), todos os indivíduos ($n=8$) do grupo montelucaste apresentaram acentuada melhora clínica deste sintoma. Nenhum indivíduo do grupo placebo com AIE ($n= 7$) relatou melhora da tosse ou dispnéia durante esforços ($p=0,0002$, teste exato de Fisher).

Como um parâmetro mais objetivo e mensurável de melhora clínica, foi avaliado o pico de fluxo expiratório antes e após o tratamento com o montelucaste e o placebo. Na fase final do tratamento, os indivíduos asmáticos

que utilizaram montelucaste aumentaram a mediana do pico de fluxo expiratório de 88,3% para 96,2% ($p=0,005$, $n=29$, teste Wilcoxon). Para o grupo placebo, a mediana do PFE foi de 88,1% antes do tratamento e de 88,6 % após 12 semanas ($p= 0,13$, $n=27$, teste Wilcoxon) (**Figura 4**). Quando se analisou o $\Delta\%$ do PFE entre os dois grupos, a mediana do grupo montelucaste foi 4%, enquanto a do placebo foi zero ($p= 0,04$, teste t com correção de Welch).

Com relações aos efeitos colaterais, dois indivíduos (5,2%) que fizeram uso do montelucaste queixaram epigastralgia, porém não interromperam a medicação, e uma adolescente, em uso de placebo, interrompeu o tratamento devido à cefaléia.

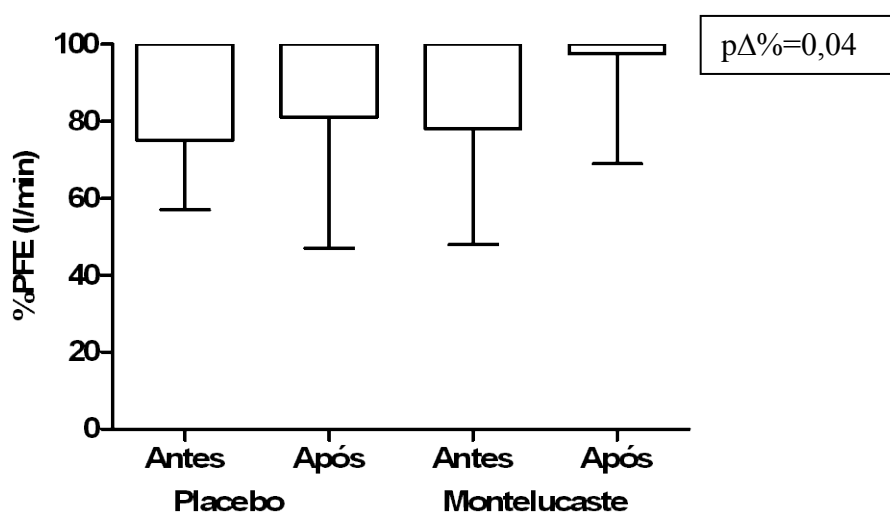


Figura 4: Análise comparativa do percentual de referência para gênero, idade e estatura do pico de fluxo expiratório (PFE) entre a fase inicial e final do tratamento. Os valores estão expressos em medianas, quartis e extremos. Não houve diferença entre o percentual do PFE antes e após 12 semanas da utilização do placebo ($p= 0,13$, $n=27$, teste de Wilcoxon), sendo significativo o aumento da mediana do PFE após o tratamento por 12 semanas com o montelucaste ($p=0,005$, $n=29$, teste de Wilcoxon) e $p\Delta\% = 0,04$, teste t com correção de Welch).

1.3. Avaliação dos eosinófilos periféricos na fase pós-tratamento

Como o número dos eosinófilos representa uma expressão das alterações imunológicas subjacentes referentes à gravidade do quadro asmático avaliamos o número destas células no sangue periférico após o tratamento com o montelucaste ou o placebo. Observamos que o tratamento

com o montelucaste foi capaz de diminuir a média±DP do número de eosinófilos no sangue periférico de 513±394,4 céls/mm³ para 485±312,1 céls/mm³ após 12 semanas de tratamento (p=0,017, teste t pareado). Observamos apenas uma tendência estatística para diminuição da média±DP dos eosinófilos do sangue periférico para os indivíduos que receberam o placebo, sendo os valores de 595,8±535,3 eosinófilos/mm³ e 456,6±408,5 eosinófilos/mm³ para antes e depois das 12 semanas (p=0,07, Wilcoxon). Após as 12 semanas de tratamento com montelucaste ou placebo não encontramos diferença ($\Delta\%$) do número absoluto de eosinófilos entre os grupos (p=1,0, Mann-Whitney).

2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS

2.1. Estado de ativação dos eosinófilos dos indivíduos asmáticos antes de iniciar o tratamento com montelucaste ou com placebo fora de período de crise.

Como os indivíduos dos dois grupos estudados mostraram antes do tratamento uma resposta clínica e laboratorial muito homogênea foi feito inicialmente a análise da correlação dos parâmetros de gravidade da asma com os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos (normal, espraçamento, eosinófilos arredondados, emissão de grânulos em pequena, moderada ou acentuada quantidade, presença de vacúolos, presença de pseudópodes localizados ou generalizados, presença de grânulos isolados, degeneração celular e comunicação celular) para todos os indivíduos conjuntamente, para melhor caracterizar a correlação basal destes parâmetros fora do período de crise asmática.

Foram analisados 75 indivíduos asmáticos e observou-se correlação inversa fraca, porém estatisticamente significativa, entre a presença de eosinófilos normais e a gravidade do quadro asmático (p=0,0004; r^s= -0,39). A emissão de grânulos isolados (p=0,02; r^s=0,25) e emissão de pseudópodes generalizados (p<0,0001; r^s= 0,47) mostraram correlação direta fraca, porém, estatisticamente significativa (**Figura 5**). Os parâmetros espraçamento (p=0,09;

$r^s=0,19$), emissão de grânulos em grande quantidade ($p=0,06$; $r^s=0,21$) e a presença de vacúolos ($p=0,05$; $r^s=0,21$), mostraram uma tendência estatística para significância. E os parâmetros eosinófilos arredondados ($p=0,27$, $r^s=0,12$), emissão de grânulos em pequena ($p=0,21$; $r^s=0,14$) e moderada ($p=0,94$; $r^s=0,008$) quantidade, emissão de pseudópodes localizados ($p=0,70$; $r^s=0,04$), degeneração celular ($p=0,25$; $r^s=-0,13$) e comunicação celular ($p=0,57$; $r^s=0,06$) não mostraram correlação estatisticamente significativa.

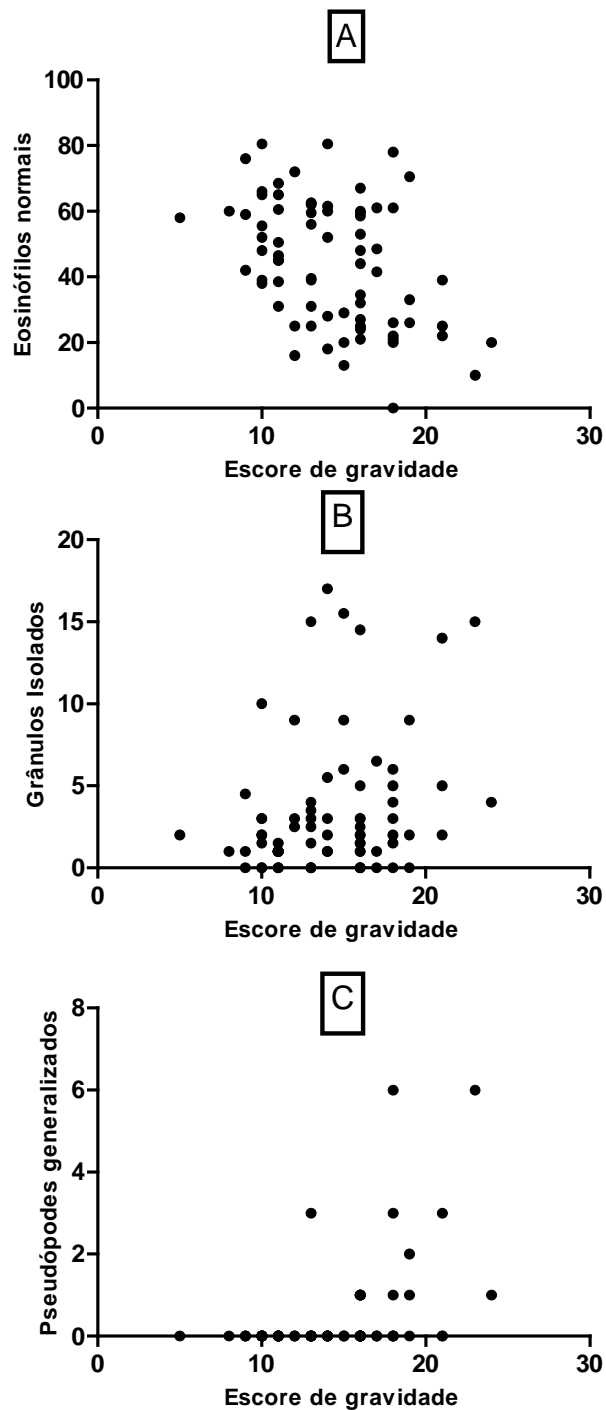


Figura 5. Correlação entre o escore de gravidade e parâmetros de ativação dos eosinófilos (normais, emissão de grânulos isolados e presença de pseudópodes generalizados) que mostraram correlação significativa. **Em A:** A porcentagem de eosinófilos normais é inversamente proporcional à gravidade ($p=0,0004$ e $r^s=-0,39$ pela correlação de Spearman). **Em B:** A porcentagem de eosinófilos apresentando emissão de grânulos isolados é diretamente proporcional à gravidade ($p=0,02$ e $r^s=0,25$, pela correlação de Spearman). **Em C:** A porcentagem de eosinófilos apresentando emissão de pseudópodes generalizados é diretamente proporcional à gravidade ($p=0,0001$ e $r^s=0,47$, pela correlação de Spearman).

No grupo tratado com montelucaste (n=40), os parâmetros de ativação dos eosinófilos que mostraram correlação significativa foram: emissão de grânulos de grande quantidade ($p=0,04$; $r^s=0,32$), emissão de pseudópodes generalizados ($p=0,0007$; $r^s=0,51$) e presença de grânulos isolados ($p=0,015$; $r^s=0,37$). Os demais parâmetros não mostraram significância estatística.

Para os indivíduos que receberam placebo (n=35), o parâmetro que mostrou correlação com a gravidade clínica de forma inversa e significativa foi: eosinófilos normais ($p=0,0001$, $r^p=-0,62$); e os parâmetros que mostraram correlação de forma direta e significativa foram: espriamento ($p=0,07$ e $r^p=0,44$), emissão de grânulos de pequena quantidade ($p=0,002$; $r^p=0,50$), emissão de pseudópode localizado ($p=0,05$; $r^s=0,33$) e emissão de pseudópodes generalizados ($p=0,008$; $r^s=0,43$). Os demais parâmetros não apresentaram significância estatística.

2.2. Análise comparativa do estado de ativação dos eosinófilos entre os três grupos na fase inicial de tratamento.

Tanto as crianças asmáticas que iniciaram tratamento com montelucaste (47,25%) como as que receberam o placebo (39%) apresentaram um percentual menor de eosinófilos com aspecto normal quando comparados com indivíduos sadios (78%) ($p<0,0001$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparação entre os grupos (montelucaste e placebo<normal) **(Figura 6)**.

Observamos que as medianas dos parâmetros de ativação dos eosinófilos, espriamento, emissão de pseudópodes localizados e presença de grânulos isolados, encontravam-se aumentados nos indivíduos asmáticos tanto nos que seriam tratados com montelucaste (29,5, $p<0,0001$; 6,75, $p=0,0006$ e 2,0, $p=0,0025$, respectivamente) ou com o placebo (30, $p<0,0001$; 6,5, $p=0,0006$ e 2,0, $p=0,0025$, respectivamente) em relação às crianças normais (10,5, $p<0,0001$; 1,0, $p=0,0006$ e zero, $p=0,0025$, respectivamente) (Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn) (placebo e montelucaste>controle) **(Figura 7)**. Entretanto, a mediana da degeneração celular encontrava-se deprimida em ambos os grupos montelucaste (zero) e placebo (zero) quando comparados às crianças sadias

(zero) ($p=0,008$, Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn) (placebo e montelucaste < controle) (**Figura 8**).

Não houve diferença estatística para os parâmetros eosinófilos arredondados, emissão de grânulos em pequena, moderada e grande quantidade, presença de vacúolos, emissão de pseudópodes generalizados e comunicação celular entre os três grupos ($p=0,09$; $p=0,33$; $p=0,32$; $p=0,85$; $p=0,99$; $p=0,39$ e $p=0,10$, respectivamente; teste de Kruskal-Wallis). Não observamos nenhum eosinófilo de crianças saudáveis apresentando comunicação celular com outras células nas lâminas examinadas.

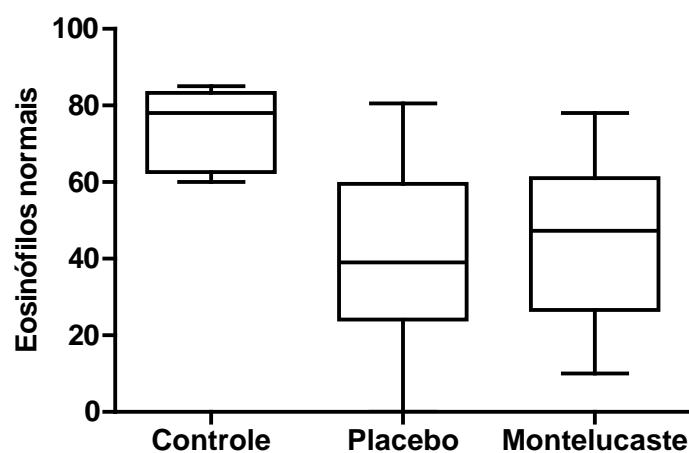


Figura 6. Análise comparativa da porcentagem de eosinófilos normais entre as crianças alocadas para os três grupos antes de iniciar tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. As crianças asmáticas apresentaram um menor número de eosinófilos normais do que as crianças saudáveis ($p<0,0001$ entre controles saudáveis *versus* placebo, teste Mann-Whitney e $p<0,0001$ entre saudáveis *versus* montelucaste, teste Mann-Whitney). Não houve diferença estatística entre os grupos placebo x montelucaste ($p=0,31$, teste t).

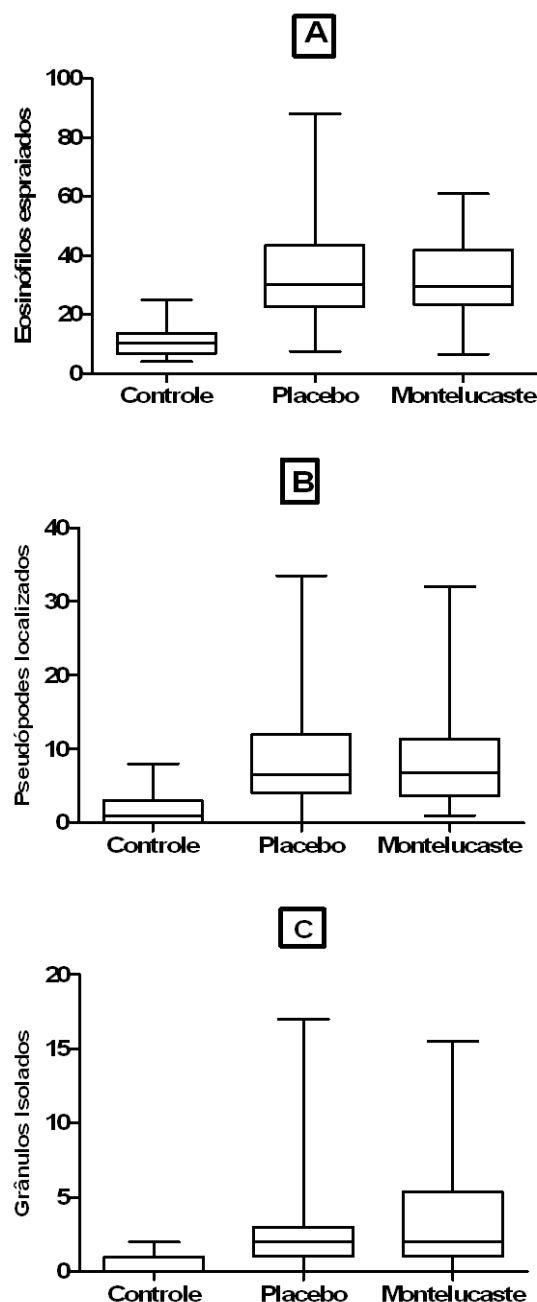


Figura 7. Análise comparativa da porcentagem de eosinófilos espraiaços, presença de pseudópodes localizados e emissão de grânulos isolados entre as crianças alocadas para os três grupos antes de iniciar tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. **Em A:** Percentual de eosinófilos espraiaços ($p < 0,0001$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de comparações múltiplas de Dunn), com maior quantidade de eosinófilos ativados no grupo montelucaste e placebo. **Em B:** Eosinófilos emitindo pseudópodes localizados. Observa-se maior emissão de pseudópodes nas crianças asmáticas que iriam iniciar tratamento com montelucaste ou placebo quando comparada às sadias ($p = 0,0006$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de comparações múltiplas de Dunn). **Em C:** A presença de grânulos isolados derivados dos eosinófilos no sangue periférico das crianças asmáticas (montelucaste ou placebo) foi significativamente maior que nas sadias

($p=0,0025$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de comparações múltiplas de Dunn).

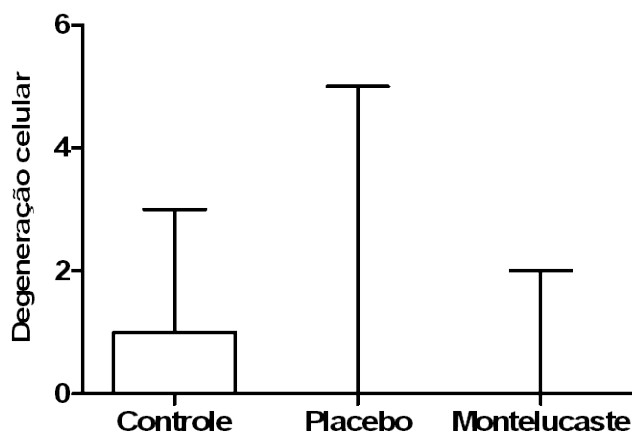


Figura 8: Análise comparativa da porcentagem de eosinófilos em degeneração celular entre as crianças alocadas para os três grupos antes de iniciar tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Os eosinófilos apresentando degeneração celular encontram-se em menor número nos indivíduos asmáticos (placebo e montelucaste) quando comparados ao controle ($p=0,0008$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn).

2.3. Comparação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos entre os indivíduos tratados com montelucaste ou placebo após 12 semanas.

Após 12 semanas de tratamento randomizado com montelucaste ou placebo, observamos que a média \pm DP ($50,8\pm 21,6$) do percentual de eosinófilos normais dos indivíduos tratados com montelucaste era maior do que a dos indivíduos do grupo placebo ($40,3\pm 19,8$), ($p=0,03$, teste t) (**Figuras 9**). Estas observações foram corroboradas pela comparação entre o percentual de aumento antes e após o tratamento entre ambos os grupo ($\Delta\%$), pelo qual observamos que a média \pm DP da variação percentual para o grupo tratado com montelucaste ($0,09\pm 0,21$) foi maior do que a do grupo placebo ($-0,02\pm 0,21$) ($p=0,02$; teste t) (**Figuras 10**).

Para os demais parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico de crianças asmáticas tratadas com montelucaste, a presença de pseudópodes generalizados e de grânulos isolados, que foram mostrados,

anteriormente, estar relacionados aos parâmetros de gravidade da doença, na **Figura 5**, foram menores para as crianças tratadas com o montelucaste quando comparado com as do grupo placebo ($p=0,02$ e $p=0,0005$, respectivamente, Mann-Whitney), (**Figura 11**). Estas observações foram corroboradas pela comparação entre o percentual de diminuição antes e após o tratamento entre ambos os grupo ($\Delta\%$), pelo qual observamos que a média \pm DP da variação percentual de pseudópodes generalizados e grânulos isolados para o grupo tratado com montelucaste ($-0,003\pm 0,014$ e $-0,033\pm 0,051$, respectivamente) foi significativamente menor do que a do grupo placebo ($0,006\pm 0,028$ e $0,019\pm 0,059$) ($p\Delta\%=0,03$ e $p=0,003$, respectivamente; Mann-Whitney).

Os parâmetros espriamento, arredondamento, emissão de grânulos de pequena, moderada e grande quantidade, presença de vacúolos, presença de pseudópodes localizados, degeneração celular e comunicação celular não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos montelucaste e placebo após 12 semanas de tratamento ($p=0,83$; $p=0,58$; $p=0,22$; $p=0,75$; $p=0,14$; $p=0,07$; $p=0,12$; $p=0,09$ e $p=0,19$, respectivamente, Mann-Whitney).

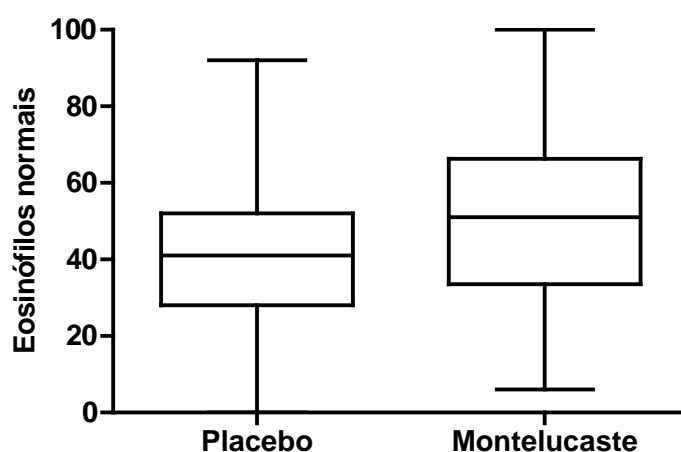


Figura 9. Análise comparativa da porcentagem de eosinófilos normais entre as crianças alocadas para o grupo placebo e montelucaste após 12 semanas de tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Observa-se um maior percentual de eosinófilos normais no grupo que utilizou montelucaste. ($p=0,03$, teste t).

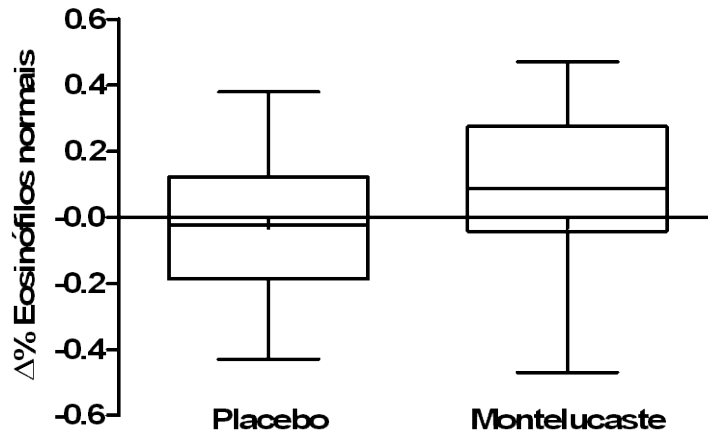


Figura 10: Análise comparativa do percentual de aumento dos eosinófilos normais antes e após o tratamento entre ambos os grupos ($\Delta\%$). Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Observa-se aumento de eosinófilos normais no grupo montelukaste quando comparado ao placebo, com $\Delta\%$ significativo ($p=0,02$, teste t).

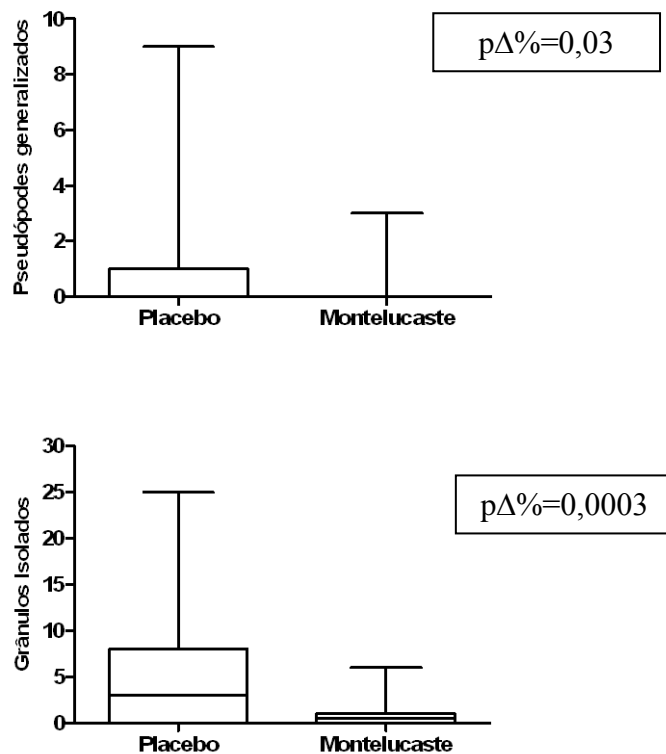


Figura 11. Análise comparativa da porcentagem de eosinófilos com pseudópodes generalizados e emissão de grânulos isolados entre as crianças alocadas para os grupos placebo e montelukaste após 12 semanas de tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. No canto superior direito encontra-se o p valor da variação entre os grupos. **Gráfico superior:** Observa-se uma maior quantidade de eosinófilos com pseudópodes localizados no grupo que utilizou placebo ($p=0,02$, Mann-Whitney). **Gráfico inferior:** A presença de grânulos isolados foi maior no grupo

que utilizou placebo quando comparado aos asmáticos tratados com montelucaste ($p=0,0005$, Mann-Whitney).

2.4. Influência do montelucaste sobre os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos em crianças e adolescentes asmáticos.

Após 12 semanas de tratamento com o montelucaste houve diminuição dos seguintes parâmetros da ativação dos eosinófilos: eosinófilos arredondados, emissão de grânulos isolados e comunicação entre as células; sendo que a mediana da presença de eosinófilos arredondados passou de 1,5 no início para zero ao seu término ($p= 0,01$, teste de Wilcoxon); a mediana da presença de emissão de grânulos isolados passou de 2,25 no início para 0,5 ao seu término ($p=0,0002$, teste de Wilcoxon); e houve diferença estatística entre as medianas da presença de comunicação entre as células, embora os valores foram de zero no início e zero ao seu término ($p=0,02$, teste de Wilcoxon). Enquanto houve aumento da mediana do percentual de eosinófilos com características morfológicas normais, que passou de 45 no início para 51 após as 12 semanas de tratamento ($p=0,03$, teste de Wilcoxon).

Não observamos modificação nos demais parâmetros do estado de ativação dos eosinófilos entre a fase inicial e final de tratamento no grupo montelucaste.

Para o grupo que utilizou placebo, apenas a mediana da proporção de eosinófilos em comunicação celular com outras células apresentou diminuição estatisticamente significativa após as 12 semanas de utilização do placebo, embora a mediana tenha sido de zero no início e zero após 12 semanas ($p=0,04$, teste de Wilcoxon). Analisando a diferença no percentual de variação entre os grupos montelucaste e placebo, observamos que a variação foi similar para os dois grupos ($\Delta\%$, $p=0,80$, Mann-Whitney).

Nas **figuras 12 e 13**, observam-se todos os parâmetros de ativação e a comparação entre as fases pré e pós-tratamento, dos grupos placebo e montelucaste.

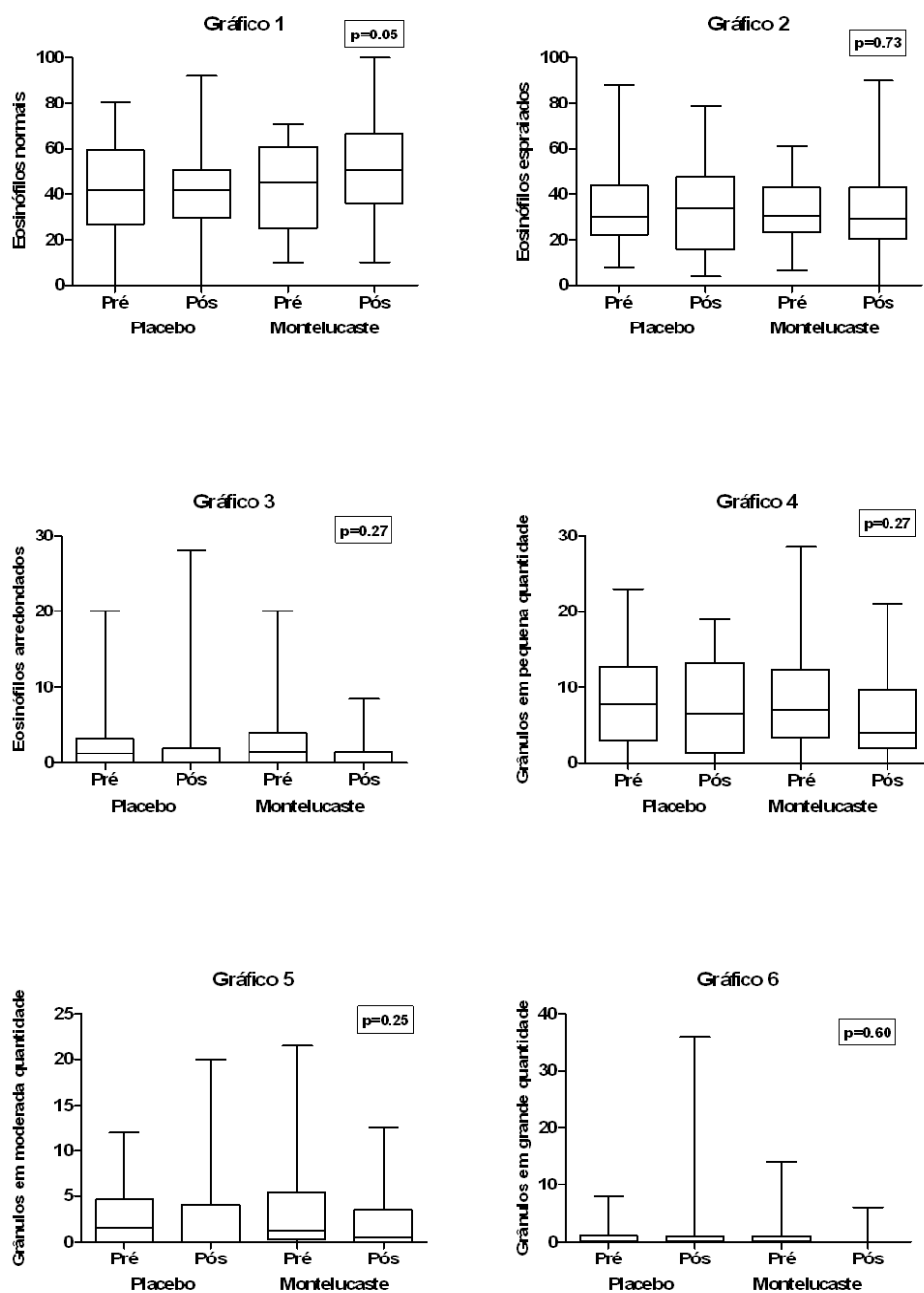


Figura 12: Análise comparativa dos efeitos do montelucaste e placebo sobre os diferentes parâmetros de ativação dos eosinófilos na fase inicial e final do tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. No canto superior direito de cada gráfico, encontra-se o valor do $\Delta\%$ de cada parâmetro quando se comparou a diferença das alterações entre placebo e montelucaste. **Gráfico 1:** Proporção de eosinófilos normais entre a fase pré e pós-tratamento. Nota-se aumento de eosinófilos normais nos pacientes tratados com montelucaste (pré x pós, $p=0,03$, teste de Wilcoxon) e ausência de significância estatística no grupo placebo ($p=0,66$, teste t). A diferença da variação entre os grupos também foi significativa ($p=0,02$, teste t). **Gráfico 2:** Não foram encontradas diferenças entre as diferentes fases de tratamento no grupo placebo e montelucaste quanto à proporção de eosinófilos espraiados

($p=0,96$ e $p=0,99$, respectivamente, teste t). **Gráfico 3:** No grupo tratado com montelucaste houve diminuição do número de eosinófilos arredondados entre a fase pré e pós-tratamento ($p=0,01$, teste de Wilcoxon). No grupo placebo o p foi de $0,06$, teste de Wilcoxon. **Gráfico 4:** Não houve diferença entre as fases de tratamento para o grupo placebo quanto ao parâmetro de emissão de grânulos de pequena quantidade (placebo $p=0,45$, teste t), enquanto para o montelucaste o valor do p foi de $0,06$, teste de Wilcoxon. **Gráfico 5:** Nota-se que não houve diferença entre as fases de tratamento no parâmetro emissão de grânulos de moderada quantidade no grupo placebo ($p=0,44$, teste t) e montelucaste ($p=0,12$, teste de Wilcoxon). **Gráfico 6:** Nenhuma diferença entre as fases pré e pós-tratamento do grupo placebo ($p=0,46$, teste de Wilcoxon) e montelucaste ($p=0,65$, teste de Wilcoxon) quanto à emissão de grânulos de grande quantidade.

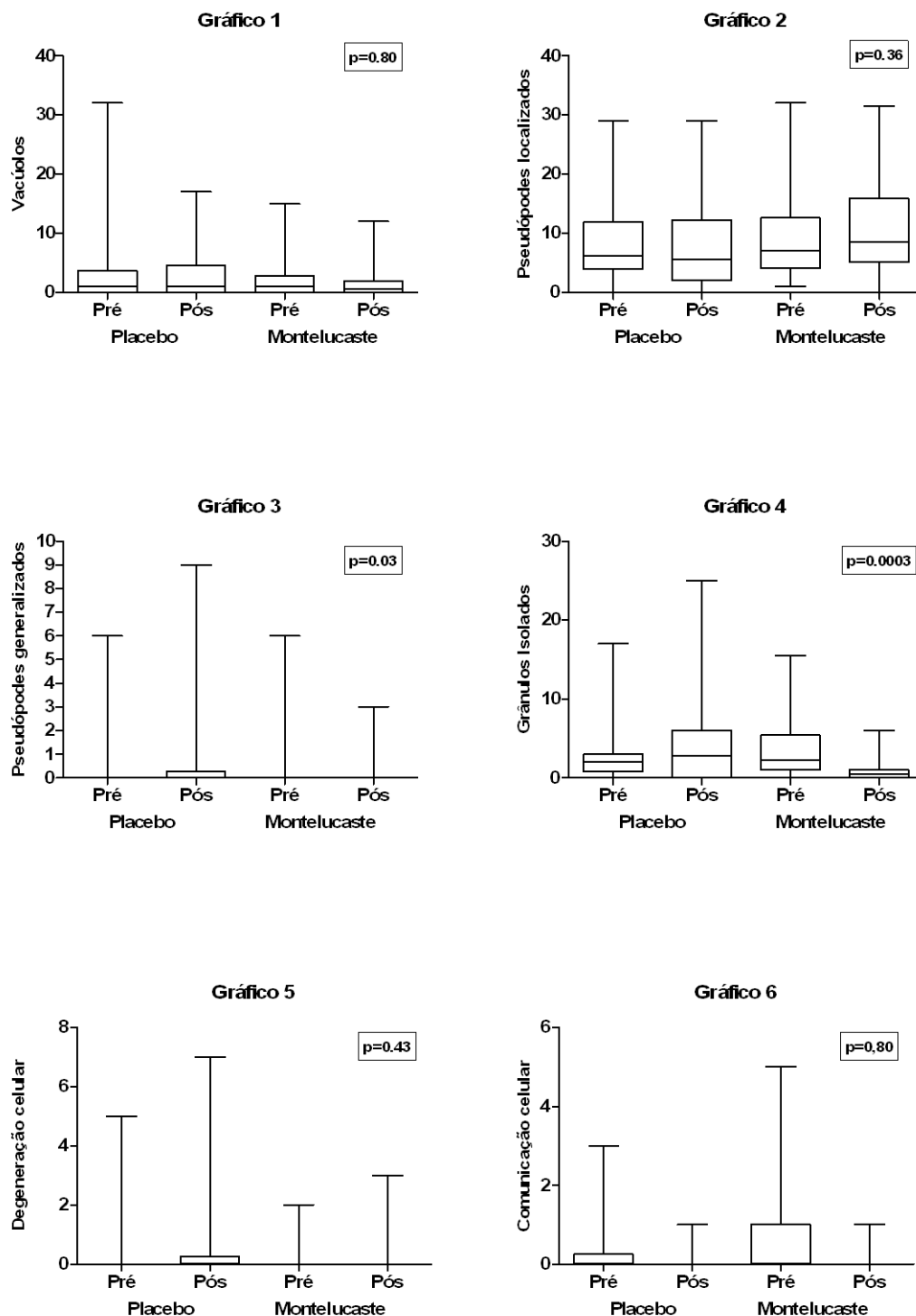


Figura 13: Análise comparativa dos efeitos do montelukaste e placebo nos sobre os diferentes parâmetros de ativação dos eosinófilos na fase inicial e final do tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. No canto superior direito de cada gráfico, encontra-se o valor do $\Delta\%$ de cada parâmetro quando se comparou a diferença das alterações entre placebo e montelukaste. **Gráfico 1:** Não houve diferença entre a fase inicial e final de tratamento quanto a presença de vacúolos nos eosinófilos dos asmáticos

tratados com placebo ($p=0,30$, teste de Wilcoxon), enquanto para o grupo montelucaste o valor do p foi de $0,07$, teste de Wilcoxon. **Gráfico 2:** Entre a fase inicial e final de tratamento do grupo placebo ($p=0,67$, Wilcoxon) e montelucaste ($p=0,28$, Wilcoxon) não foram encontradas diferenças quanto a presença de pseudópode localizado. **Gráfico 3:** Embora tenha sido encontrado menor quantidade de eosinófilos emitindo pseudópodes generalizados na fase final de tratamento entre o grupo placebo e montelucaste ($\Delta\% p= 0,03$, teste Mann-Whitney), entre cada grupo (placebo ou montelucaste) não houve significância estatística nas diferentes fases de tratamento. **Gráfico 4:** Não houve diferença para o parâmetro de emissão de grânulos isolados no grupo placebo na fase final de tratamento, ($p=0,37$, teste de Wilcoxon). Quanto aos asmáticos tratados com montelucaste, nota-se acentuada diminuição de grânulos isolados ($p=0,0002$, teste de Wilcoxon), inclusive com diferença na variação entre os grupos ($\Delta\% p= 0,0003$, teste de Mann-Whitney). **Gráfico 5:** Não houve diferença entre a fase inicial e final de tratamento quanto à presença de degeneração celular no grupo placebo ($p= 0,40$, teste de Wilcoxon) e grupo montelucaste ($p=0,34$, teste de Wilcoxon). **Gráfico 6:** Tanto no grupo placebo quanto no grupo montelucaste, ocorreu diminuição do número de eosinófilos com comunicação celular entre as fases de tratamento (placebo $p = 0,04$ e montelucaste $p=0,02$, teste de Wilcoxon), porém não foi encontrada diferença nesta variação entre os grupos ($\Delta\% p= 0,80$, teste de Mann-Whitney).

2.5. Influência do montelucaste sobre a ativação dos eosinófilos segundo os diferentes tratamentos profiláticos realizados pelos pacientes asmáticos.

Para verificar a possível existência de interferência nos efeitos do montelucaste pelos tratamentos profiláticos associados para asma que já eram realizados pelo paciente antes do início da pesquisa, avaliamos os 12 parâmetros de ativação dos eosinófilos em cada grupo (placebo ou montelucaste), segundo o tratamento previamente utilizado.

Quarenta e seis crianças asmáticas, antes do início do projeto, utilizavam corticóide inalatório (budesonida ou beclometasona). Destas, 25 foram randomizadas para o grupo montelucaste e 21 para o grupo placebo. Na análise da influência do montelucaste quando associado ao corticóide inalatório entre as diferentes etapas de tratamento, observou-se que, na fase final do tratamento, houve diminuição significativa nos seguintes parâmetros: presença de grânulos isolados ($p=0,0009$, teste de Wilcoxon) e comunicação celular ($p= 0,05$, teste de Wilcoxon). Doze crianças faziam uso de corticóide inalatório associado à agente β_2 de longa ação (LABA), sendo 50% randomizada para

cada grupo. Quanto a este tipo de tratamento não se observou diferença em nenhum parâmetro de ativação dos eosinófilos nas diferentes fases de tratamento com montelucaste.

Vinte e quatro crianças que foram incluídas no projeto, não faziam uso de nenhuma medicação profilática e 11 foram randomizadas para o tratamento com montelucaste. Neste grupo observou-se apenas a influência do montelucaste, entre a fase inicial e final de tratamento que ocasionou aumento dos eosinófilos normais ($p=0,03$, teste t pareado) e diminuição da emissão de grânulos de pequena quantidade ($p=0,02$, teste t pareado) (**Figura 14**).

Nenhuma alteração, independentemente de estar utilizando corticóide inalatório, corticóide inalatório associado à β_2 agonista ou nenhum tratamento foi encontrada, em todos os parâmetros de ativação dos eosinófilos, nos asmáticos que utilizaram placebo.

Apenas um paciente fazia uso de imunoterapia específica para ácaros devido rinite alérgica associada e este foi randomizado para o grupo placebo.

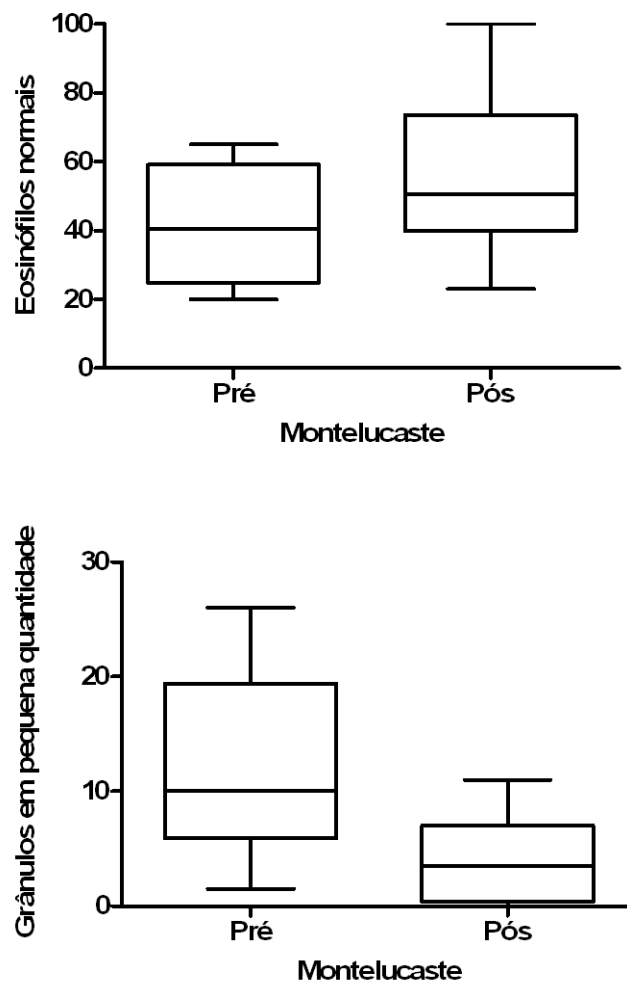


Figura 14: Efeito do montelucaste nos pacientes virgens de tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. **Gráfico superior:** Nota-se um aumento de eosinófilos normais (não ativados) na fase final do tratamento ($p=0,03$, teste t). **Gráfico inferior:** O montelucaste causou diminuição do número de eosinófilos emitindo grânulos de pequena quantidade na fase final de tratamento ($p=0,02$, teste t).

3. INFLUÊNCIA DO MONTELUCASTE SOBRE A CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO AVALIADA PELO TESTE DO *NITROBLUE TETRAZOLIUM* (NBT)

Pelo teste do NBT estimamos a capacidade dos fagócitos de produzirem radicais de oxigênio. O *nitroblue tetrazolium* é um corante solúvel amarelo, que serve como receptor de elétrons e após a ativação do metabolismo oxidativo reduz-se pela NADH-oxidase, formando a formazana, um produto azul escuro

insolúvel e que é identificável no citoplasma dos fagócitos por microscopia óptica. As células foram quantificadas pela determinação da porcentagem dos fagócitos que reduziram o NBT. Deste percentual, classificou-se a capacidade de redução em forte (formação de cristais azuis escuro no citoplasma), normal (citoplasma corado de azul, porém sem cristais) e fraca (presença de pequenos grânulos azuis no citoplasma).

3.1. Teste do NBT basal

Não houve diferença estatística da porcentagem de redução do NBT pelos fagócitos entre os grupos montelucaste (83,2%±11,3%), placebo (79,5%±15,5%) e controle (80,4%±7,2%) na fase inicial (p=0,73, teste de ANOVA), como também no final do tratamento (p=0,61, teste de ANOVA). A média da porcentagem de redução do NBT nesta etapa para o grupo montelucaste foi 83,8%±9,6% e para grupo placebo foi 83,7±9,6% (**Figura 15**).

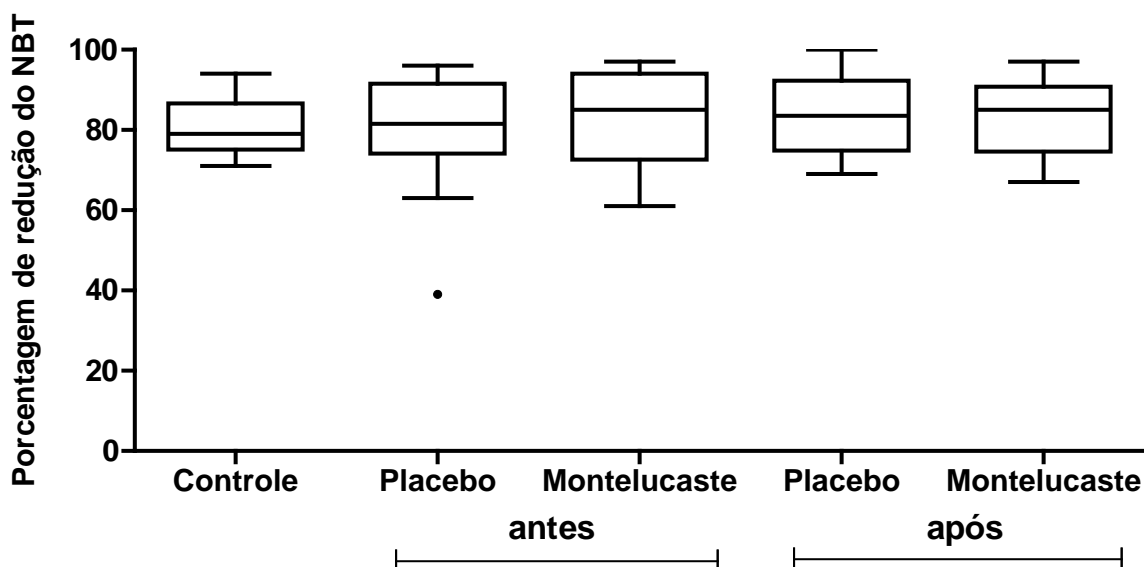


Figura 15. Porcentagem de fagócitos que reduziram o NBT basal de crianças saudáveis e crianças asmáticas tratadas com placebo ou montelucaste antes e após 12 semanas de tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença estatística na porcentagem de redução do NBT entre os grupos (p=0,79, teste ANOVA).

Quanto à avaliação do potencial de redução dos fagócitos (redução forte, normal ou fraca), observamos que antes do tratamento com o montelucaste ou placebo, as crianças asmáticas apresentavam uma maior

capacidade de redução forte do NBT (**Figura 16E**) ($p=0,01$, teste ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls) e uma menor capacidade de redução fraca do corante (**Figura 16C**) ($p=0,01$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn) (placebo e montelucaste < controle) do que as crianças normais, sem haver diferença entre os grupos tratados posteriormente com o montelucaste ou com o placebo. Posteriormente às 12 semanas de tratamento com o montelucaste ou placebo, as crianças asmáticas submetidas aos dois tipos de tratamento (montelucaste ou placebo) aumentaram a porcentagem de fagócitos que reduziram de modo normal o corante (**Figura 16B**, $p=0,002$, teste ANOVA), principalmente devida à diminuição dos fagócitos que reduziram fortemente o NBT (**Figura 16F**, $p=0,99$, teste de ANOVA) e **tabela 5**.

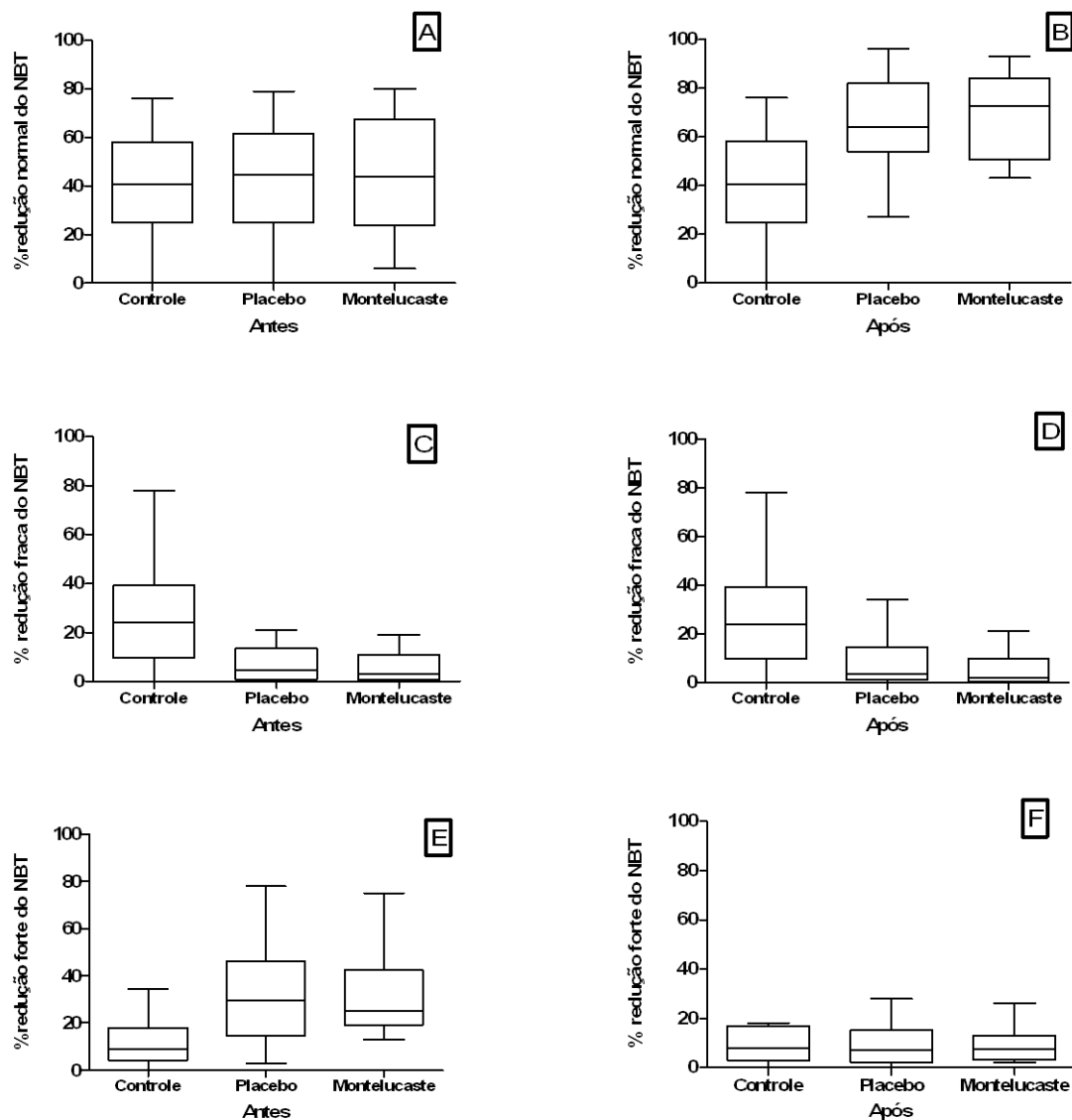


Figura 16: Análise comparativa do potencial de redução do NBT entre os três grupos antes e após 12 semanas de tratamento. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. **Figura A:** Potencial de redução normal entre os grupos na fase inicial do tratamento ($p=0,92$, teste ANOVA). **Figura B:** Potencial de redução normal entre os grupos na fase final do tratamento ($p=0,002$, teste ANOVA), com diferença entre o grupo controle com placebo ($p=0,006$, teste t) e com montelukaste ($p=0,002$, teste t). **Figura C:** Potencial de redução fraca entre os grupos na fase inicial do tratamento ($p=0,013$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn), com diferença entre o grupo controle e placebo ($p=0,01$, Mann-Whitney) e com montelukaste ($p=0,008$, Mann-Whitney). **Figura D:** Potencial de redução fraca entre os grupos na fase final do tratamento ($p=0,014$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). **Figura E:** Potencial de redução forte entre os grupos na fase inicial do tratamento ($p=0,014$, teste ANOVA) com diferença entre os sadios e placebo ($p=0,01$, teste t) e montelukaste ($p=0,004$, teste t). **Figura F:** Potencial de redução forte entre os grupos na fase final do tratamento ($p=0,99$, teste ANOVA).

Tabela 5: Mediana da capacidade de redução dos fagócitos, *in vitro*, pelo teste do NBT observada nos indivíduos asmáticos (placebo e montelucaste) e controle antes e após 12 semanas de tratamento.

Potencial de redução Grupos	Normal			Fraco			Forte		
	Antes	Após	P	Antes	Após	p	Antes	Após	P
Controle	40,5 ^{ab}	40,5 ^{ab}	-	24,0 ^{ab}	24,0 ^b	-	9,0 ^{ab}	8,0	-
Placebo	44,5	64,0	0,02***	4,5	3,5	0,87****	29,5	7,0	0,002***
Montelucaste	44,0	72,5	0,01***	3,0	2,0	0,76***	25,0	7,5	0,001***
p valor¹	0,92*	0,002*		0,01**	0,01**		0,01*	0,99*	

¹ Comparação entre os três grupos.

* p<0,05 Teste de ANOVA. Pós-teste de Newman-Keuls.

** p<0,05 Teste de Kruskal-Wallis. Pós-teste de Dunn.

*** p<0,05 Teste t e **** p<0,05 Teste Wilcoxon

^a p<0,05 controle *versus* placebo.

^b p<0,05 controle e *versus* montelucaste.

Não foram observadas diferenças no NBT basal entre o grupo placebo e montelucaste quanto aos diferentes tipos de tratamento que as crianças asmáticas já utilizavam antes do projeto: corticóide inalatório (p=0,67, teste t não pareado) e nenhum tratamento (p=0,48, teste t não pareado). Não foi possível a análise estatística do uso concomitante de corticóide inalatório associado à β_2 agonista pois, somente um paciente do grupo placebo fez uso.

3.2. Teste do NBT estimulado

Para avaliar a influência do montelucaste sobre a produção de radicais de oxigênio em condições ótimas, o teste do NBT foi realizado com os fagócitos concomitantemente estimulados para produção de radicais livres com $6,25 \times 10^4$ leveduras *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas. Não houve diferença estatística na porcentagem de redução do NBT pelos fagócitos entre as crianças asmáticas e controles antes do tratamento com o montelucaste ou placebo (p=0,59, teste ANOVA), nem após 12 semanas dos tratamentos (p=0,34, teste de Kruskal-Wallis). Entretanto, quando se analisou isoladamente o efeito do montelucaste antes e após as 12 semanas de tratamento, observou-se aumento da mediana da capacidade de redução do NBT pelos fagócitos estimulados de 84,5 para 94,5, p= 0,04, teste Wilcoxon). Enquanto não houve diferença estatística para o grupo placebo entre a fase inicial e final do

tratamento ($83,1 \pm 14,2$ e $89,9 \pm 9,3$, respectivamente) ($p=0,19$, teste t) (**Figura 17**).

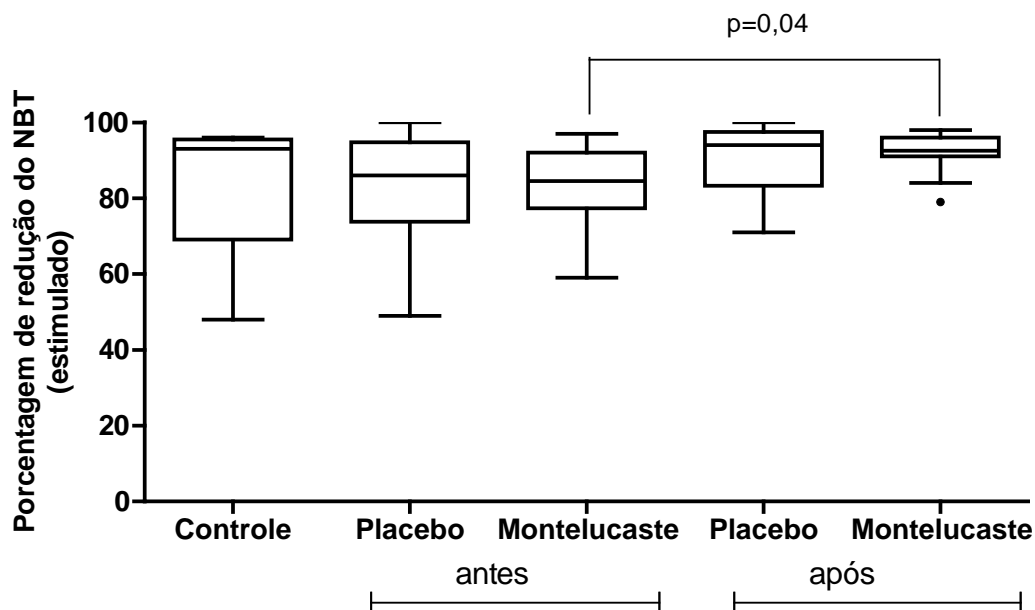


Figura 17: Porcentagem de fagócitos estimulados com $6,25 \times 10^4$ *Saccharomyces cerevisiae* que reduziram o NBT em crianças saudáveis e asmáticas (placebo e montelucaste) antes e após 12 semanas de tratamento. A diferença estatística foi significativa pela comparação do grupo tratado com montelucaste antes e após 12 semanas ($p=0,04$, teste Wilcoxon).

4. CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DOS NEUTRÓFILOS DE CRIANÇAS ASMÁTICAS E CONTROLES.

4.1. Influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos de indivíduos asmáticos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.

A influência do montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, como manose e glucana, foi avaliada pelo índice fagocitário, proporção de monócitos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilos, comparativamente, entre indivíduos asmáticos e controles normais, como também antes e após o tratamento. Estes experimentos utilizaram soro fetal bovino inativado, e foram conduzidos

utilizando-se uma suspensão de 2×10^5 *Saccharomyces cerevisiae* por escavação.

A média do índice fagocitário dos neutrófilos dos indivíduos asmáticos que foram alocados para receber o montelucaste ($16,2 \pm 9,5$) ou o placebo ($19,9 \pm 9,9$) foi cerca de 2x menor do que a do grupo de indivíduos saudáveis ($35 \pm 20,4$) ($p=0,006$, teste ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls de múltiplas comparações; placebo e montelucaste < controle), antes de iniciar o tratamento (**Figura 18C**). Para o grupo que iria receber o montelucaste esta diminuição deveu-se ao menor envolvimento dos neutrófilos na fagocitose, sendo a mediana da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose dos asmáticos alocados para receber o montelucaste 2 vezes menor (8,4%) do que a dos indivíduos saudáveis (16,2%) ($p=0,02$, ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls de múltiplas comparações (**Figura 18B**), pois não houve diferença entre as médias \pm DP das leveduras aderidas/ingeridas pelos neutrófilos entre os indivíduos alocados para receber o placebo ($1,89 \pm 0,59$) ou montelucaste ($1,98 \pm 0,95$) e os indivíduos saudáveis ($2,2 \pm 0,56$) antes do tratamento ($p=0,61$; teste ANOVA); **Figura 18A**). Embora, para o grupo placebo não foi observada diferença na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose entre o grupo de asmáticos que foi alocado para receber o placebo (11%) e os controles saudáveis (16,2%) ($p=0,09$, teste t).

Após 12 semanas de tratamento, a mediana do índice fagocitário dos indivíduos tratados com montelucaste (14,5) foi 2x menor que a dos indivíduos do grupo controle normal (31) e para aqueles que utilizaram placebo (6) foi 5x menor do que a dos indivíduos normais ($p=0,0005$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn), tal fato ocorreu devido menor proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose no grupo placebo (3%) e montelucaste (8%) quando comparado aos controles saudáveis (15%) ($p=0,001$, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Não foi encontrada diferença entre os grupos quanto à média de leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilo ($p=0,36$, Kruskal-Wallis, **Figura 18A**).

Avaliando o índice fagocitário dos indivíduos que receberam montelucaste antes e após 12 semanas de tratamento, observamos que a droga não influenciou a fagocitose, sendo que a mediana do índice fagocitário passou de 18 para 14,5 ($p=0,82$, Wilcoxon), a média \pm DP da proporção de

leveduras aderidas/ingeridas passou de $2,0 \pm 0,9$ leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilo para $1,9 \pm 0,6$ leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilo ($p=0,87$, teste t) e a média proporção de neutrófilos envolvidos da fagocitose passou de $8,5\% \pm 6,6\%$ para $9,0\% \pm 7,3\%$ ($p=0,88$, teste t). Enquanto que para os indivíduos que utilizaram placebo, a média do índice fagocitário passou de $20,6 \pm 10$ para $5,9 \pm 3,5$ ($0,001$, teste t), e esta diminuição deveu-se ao menor envolvimento da proporção de neutrófilos na fagocitose, que passou de 11% para 3% ($p=0,005$, Wilcoxon). Não foi encontrada diferença na média de leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilo para os indivíduos que utilizaram placebo ($p=0,24$, Wilcoxon).

Houve diferença na porcentagem de variação do índice fagocitário ($\Delta\%$) entre o grupo placebo e montelucaste ($p\Delta\%=0,05$, teste t, **Figura 18C**) e na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose ($p\Delta\%= 0,03$, Mann-Whitney, **Figura 18B**). Tal fato ocorreu devido ao menor envolvimento da proporção de neutrófilos na fagocitose, para os indivíduos do grupo placebo, que foi quase três vezes menor quando comparada aos tratados com montelucaste após 12 semanas de tratamento.

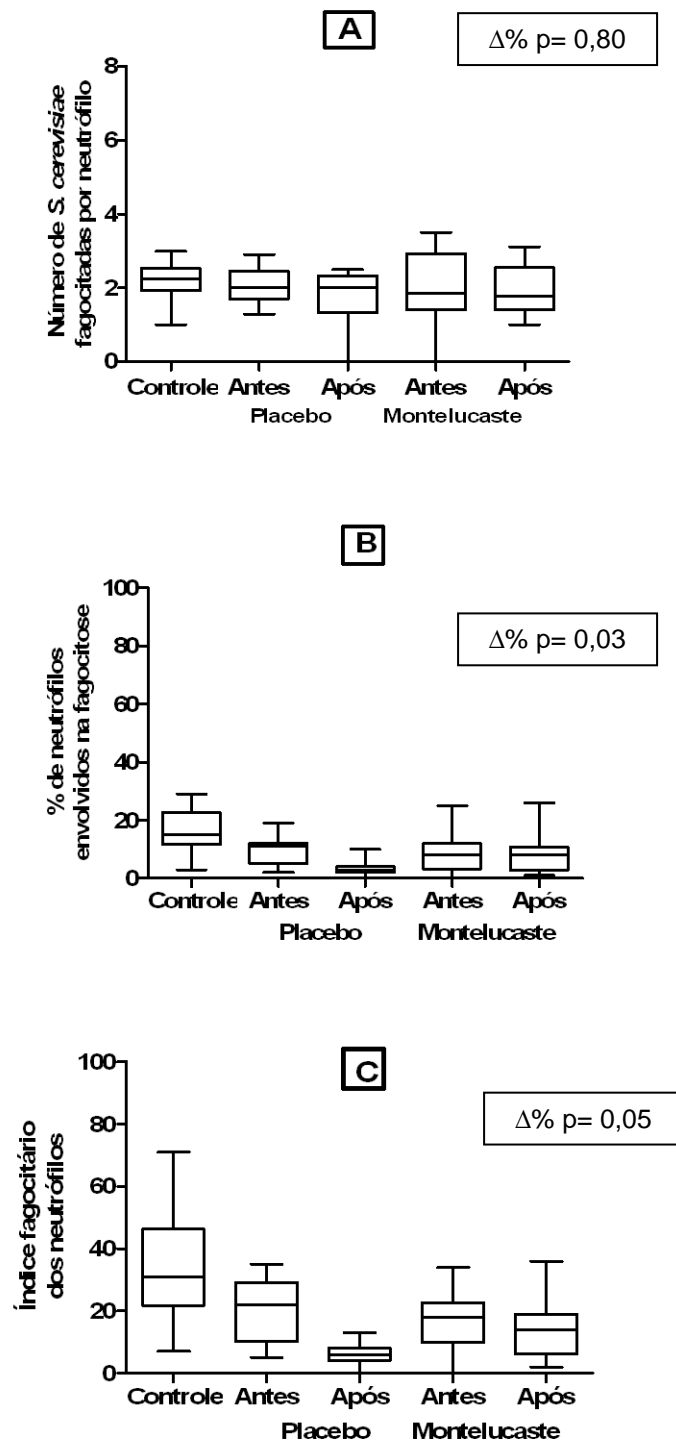


Figura 18: Capacidade fagocitária dos neutrófilos dos indivíduos asmáticos que receberam placebo ou montelucaste e indivíduos controles normais pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. Os neutrófilos foram incubados com 2×10^5 leveduras *S.cerevisiae* não sensibilizadas, por orifício da lâmina. Os dados estão expressos como mediana, quartis e extremos. No canto superior à direita de cada gráfico encontra-se o valor do p do $\Delta\%$ entre os grupos montelucaste e placebo. **Gráfico A:** A média do número de *S.cerevisiae* ingeridas/aderidas por neutrófilo não apresentou diferença estatística entre os

grupos na fase inicial ($p=0,61$, teste de ANOVA) e final de tratamento ($p=0,36$ teste de Kruskal-Wallis). **Gráfico B:** Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose entre os grupos na fase inicial ($p=0,02$, teste ANOVA seguido pelo método de múltiplas comparações de Newman-Keuls, controle>montelucaste>placebo) e final de tratamento ($p=0,001$, teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, controle>montelucaste>placebo). Tal fato ocorreu devido a acentuada diminuição da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose após 12 semanas de utilização do placebo ($p=0,005$, teste de Wilcoxon), pois não houve diferença entre as fases no grupo montelucaste ($p=0,87$, teste t). **Gráfico C:** O índice fagocitário dos indivíduos asmáticos alocados para o grupo montelucaste e placebo foi menor que o do grupo controle na fase inicial ($p=0,006$, teste ANOVA seguido pelo método de múltiplas comparações de Newman-Keuls) e na fase final de tratamento ($p=0,0005$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn). Houve acentuada diminuição deste índice entre as fases pré e pós tratamento no grupo placebo ($p=0,001$, teste t pareado).

4.2. Influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos de indivíduos asmáticos pelos receptores para opsoninas.

A influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para opsoninas (componentes do sistema complemento e para a fração Fc da imunoglobulina) foi avaliada utilizando o plasma fresco dos próprios indivíduos como fonte de opsoninas.

Não observamos diferença no índice fagocitário ($p=0,16$, teste ANOVA), proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose ($p=0,14$, Kruskal-Wallis) e na média de partículas fagocitadas ($p=0,24$, teste ANOVA) entre os três grupos estudados antes do tratamento (**Figura 19 A, B e C**).

Na fase final do tratamento, não foram encontradas diferenças, entre os três grupos, no índice fagocitário ($p=0,95$, teste ANOVA), na média de leveduras aderidas/ingeridas ($p=0,69$, teste ANOVA) e na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose para os grupos placebo (95%), montelucaste (96%) e controle (97%) ($p=0,72$, Kruskal-Wallis) (**Figura 19 A, B e C**).

Avaliando o efeito do montelucaste entre a fase inicial e final de tratamento, observou-se que a média do índice fagocitário passou de

370,6±113,3 para 301±62,1 (p= 0,06, teste t), a mediana da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose passou de 97,5% para 96% (p=0,67, Wilcoxon) e a média de leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilo passou de 3,93±1,0 leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilo para 3,1±0,6 leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilos (p=0,06, teste t). Quanto ao grupo placebo, a média do índice fagocitário passou de 283±141,8 para 304,5±129,6 (p=0,64, teste t). A mediana da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose passou de 90,5% para 95% (p=0,07, Wilcoxon) e a média de leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilos passou de 3,3±1,1 para 3,2±1,3 leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilo (p=0,74, teste t) (**Figura 19**).

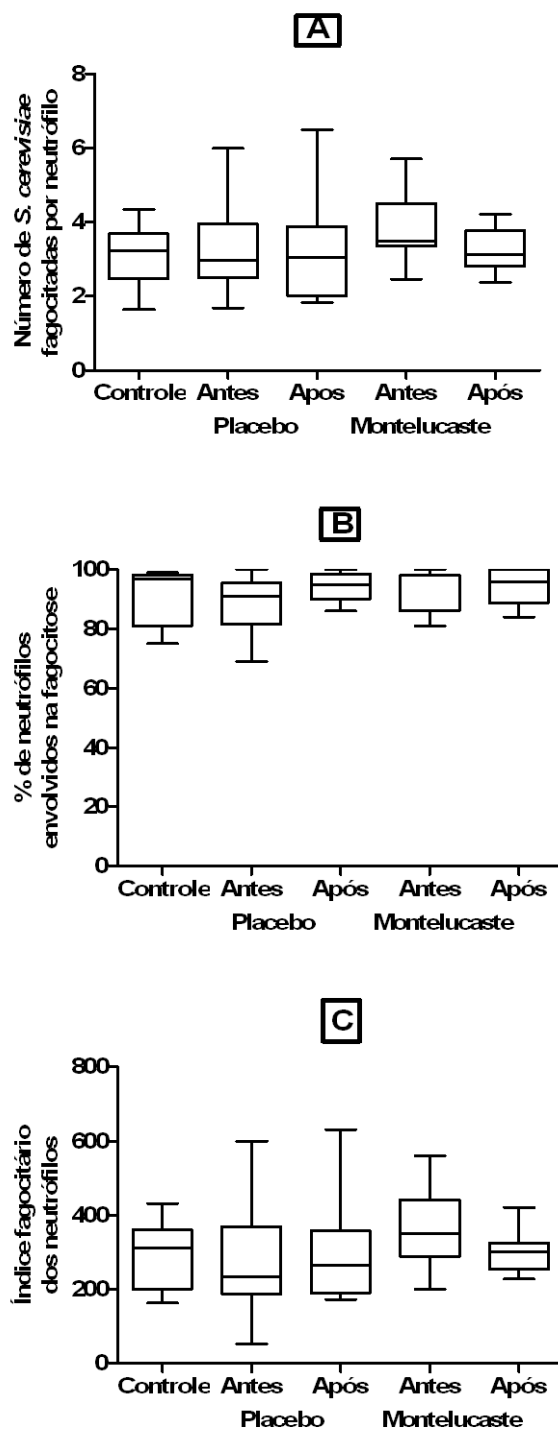


Figura 19: Capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para opsoninas dos indivíduos asmáticos que receberam placebo ou montelucaste e indivíduos controles normais. Os neutrófilos foram incubados com 2×10^5 leveduras *S. cerevisiae* sensibilizadas, por orifício da lâmina. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. **Gráfico A:** Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilos antes do tratamento ($p=0,24$, teste ANOVA) e após tratamento ($p=0,69$, teste ANOVA). **Gráfico B:** Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose antes ($p=0,14$, Kruskal-Wallis) e após 12 semanas de

tratamento ($p=0,72$, Kruskal-Wallis). **Gráfico C:** Índice fagocitário na fase inicial ($p=0,16$, teste ANOVA) e final do tratamento ($p=0,95$, teste ANOVA).

5. CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DOS MONÓCITOS DE CRIANÇAS ASMÁTICAS E CONTROLES.

5.1. Influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos asmáticos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.

A capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, como manose e glucana, foi avaliada pelo índice fagocitário, proporção de monócitos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas/aderidas por monócitos.

Antes do tratamento não foram encontradas diferenças estatísticas em todos os parâmetros da fagocitose, média de leveduras ($p= 0,18$, teste ANOVA), proporção de monócitos ($p= 0,27$, Kruskal-Wallis) e índice fagocitário ($p=0,61$, Kruskal-Wallis), entre o grupo controle sadio, asmáticos que seriam alocados no grupo placebo e no grupo montelucaste (**Figura 20**).

Quando se comparou os três grupos após 12 semanas de tratamento, observou-se que a mediana do número de leveduras fagocitadas por monócito era menor nos indivíduos asmáticos alocados no grupo placebo (1,2) ou montelucaste (1,3) quando comparado ao grupo controle sadio (1,6) ($p=0,03$, Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn, **Figura 20A**) (placebo e montelucaste<controle), embora não tenha havido diferença entre os três grupos na análise da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,29$, Kruskal-Wallis) e no índice fagocitário ($p=0,31$, teste de Kruskal-Wallis).

Quanto à análise comparativa entre a fase inicial e final do tratamento, a mediana do número de leveduras aderidas/ingeridas por monócito no grupo que utilizou placebo variou de 1,6 para 1,2 leveduras aderidas/ingeridas por monócito ($p=0,019$, teste de Wilcoxon) e nos asmáticos tratados com montelucaste variou de 1,9 para 1,2 leveduras aderidas ingeridas/monócito ($p=0,006$, teste t pareado), sem diferença no percentual de variação ($\Delta\%$)

entre os grupos placebo e montelucaste ($p=0,34$, Mann-Whitney) **(Figura 20A)**. O índice fagocitário não apresentou diferença entre a fase inicial e final nos grupos placebo ($p=0,16$, teste t pareado) ou montelucaste ($p=0,35$, teste t pareado). A proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, também não apresentou diferença entre a fase inicial e final de tratamento nos grupos placebo ($p=0,4$, teste t pareado) ou montelucaste ($p=0,75$, teste t pareado) **(Figuras 20B e C)**.

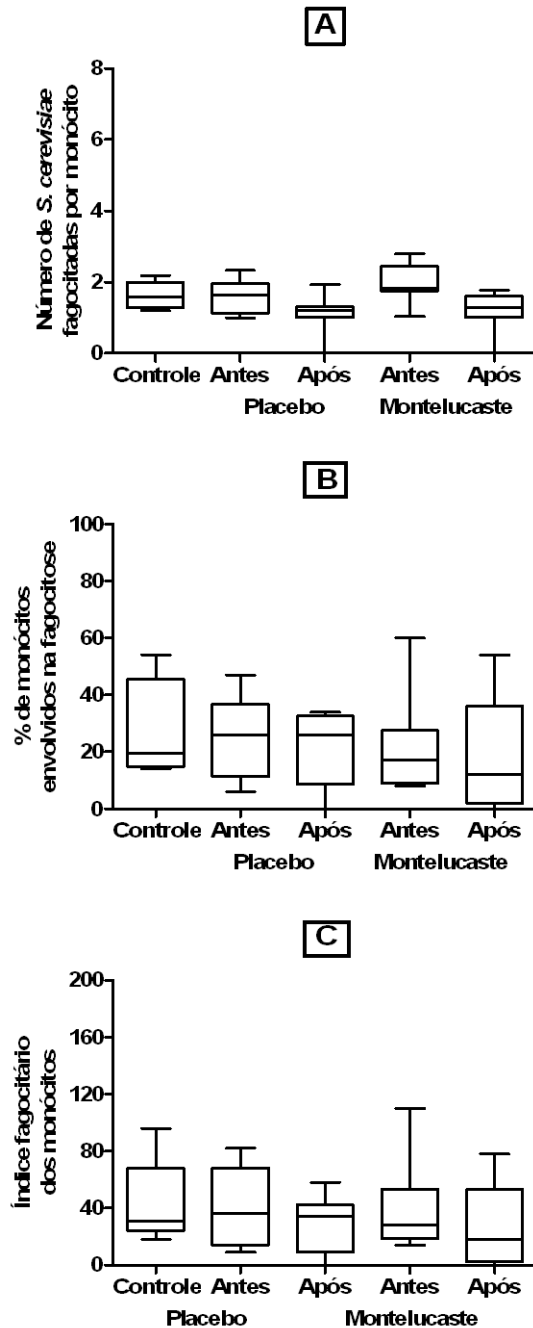


Figura 20: Comparação da capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos entre os indivíduos controles normais e asmáticos (placebo e montelucaste), na fase inicial e final do tratamento. Os monócitos foram incubados com 2×10^5 leveduras *S.cerevisiae* não sensibilizadas, por orifício da lâmina. Os dados estão expressos como mediana, quartis e extremos. **Gráfico A:** Média do número de *S.cerevisiae* ingeridas/aderidas por monócito. Observa-se mediana menor nos grupos placebo e montelucaste quando comparado ao controle na fase final de tratamento ($p=0,03$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de múltiplas comparações de Dunn e $\Delta\%$ com $p=0,34$, Mann-Whitney) **Gráfico B:** Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose na fase inicial ($p=0,27$, Kruskal-Wallis) e final de tratamento ($p=0,29$, teste de Kruskal-Wallis). **Gráfico**

C: Índice fagocitário dos monócitos sem diferença entre os três grupos na fase inicial ($p=0,61$, Kruskal-Wallis) e final de tratamento ($p=0,31$, Kruskal-Wallis).

5.2. Influência do tratamento com montelucaste sobre a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos asmáticos e indivíduos saudáveis pelos receptores para opsoninas.

Antes de iniciar o tratamento, a análise comparativa dos três grupos não mostrou diferença para nenhum dos parâmetros da fagocitose: média de leveduras fagocitadas ($p=0,58$, teste ANOVA), proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,32$, teste ANOVA) e índice fagocitário dos monócitos ($p=0,44$, teste de Kruskal-Wallis).

Ao final das 12 semanas de tratamento, houve diferença na média da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose entre os grupos montelucaste ($52,8\% \pm 11,6\%$), placebo ($64\% \pm 16,6$) e controle ($75,8\% \pm 13,3\%$) ($p=0,004$, ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls) (placebo e montelucaste < controle). Nenhuma diferença foi encontrada no índice fagocitário ($0,09$, Kruskal-Wallis) e na média de leveduras aderidas/ingeridas por monócito ($0,97$, ANOVA) após 12 semanas.

Para verificar o tipo de resposta dos monócitos ao tratamento com o montelucaste por 12 semanas para cada parâmetro da fagocitose, foram analisados, o índice fagocitário, a proporção dos monócitos envolvidos na fagocitose e a média de partículas fagocitadas antes e após o tratamento. Observamos que o índice fagocitário variou de $172,6 \pm 48,3$ para $111,6 \pm 62,5$ ($p=0,02$, teste t pareado, **Figura 21C**), tal fato ocorreu devido a redução da média \pm DP da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de $77\% \pm 9\%$ para $53,2\% \pm 12,7\%$ ($p=0,008$, teste t, **Figura 21B**), pois não ocasionou alteração no número de leveduras aderidas/ingeridas por monócito ($p=0,53$, teste t pareado, **Figura 21A**).

Nos pacientes que utilizaram placebo, nenhuma alteração ocorreu entre a fase inicial e final de tratamento na média de leveduras aderidas/ingeridas por monócito ($p=0,14$, teste t pareado), na proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,48$, teste t pareado) e no índice fagocitário ($p=0,24$, Wilcoxon) (**Figura 21 A, B e C**).

Como tanto o grupo tratado com montelucaste quanto o grupo tratado com placebo diminuíram a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose após as 12 semanas de tratamento, analisamos a variação percentual entre ambos para verificar se eram diferentes ou devidas ao acaso. Observamos que a diferença percentual ($\Delta\%$) da redução da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ocorrida no grupo montelucaste foi significante maior do que a apresentada pelo grupo placebo ($p=0,04$, teste t não pareado). Para os demais parâmetros de avaliação da fagocitose, índice fagocitário ($p=0,46$, teste t não pareado) e média de leveduras fagocitadas ($p=0,67$, teste t não pareado) não houve diferença $\Delta\%$ entre os dois grupos . Não foram encontradas diferenças estatísticas na fagocitose dos monócitos (PMPr e receptores para opsoninas) com relação aos diferentes tipos de tratamento já utilizados pelas crianças asmáticas (CI e CI associado a $\beta 2$ - de longa ação).

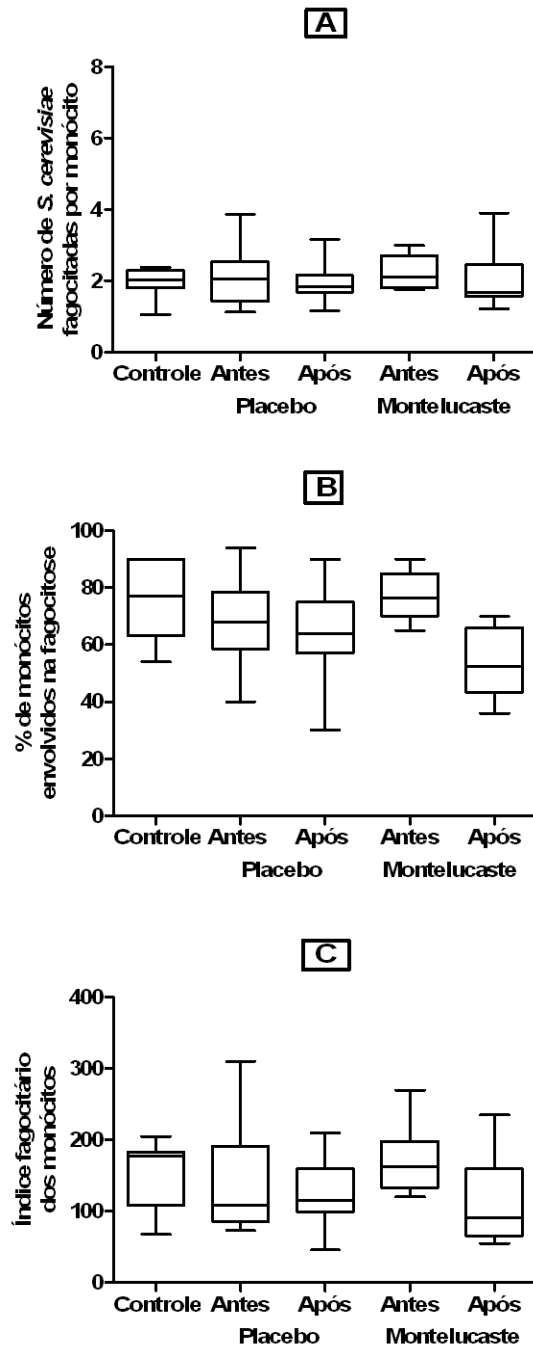


Figura 21: Comparação da capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para opsoninas entre os indivíduos saudáveis (controle) e asmáticos (placebo e montelucaste) na fase inicial e final do tratamento. Os monócitos foram incubados com 2×10^5 leveduras *S. cerevisiae* sensibilizadas, por orifício de placa. Os dados estão expressos como mediana, quartis e extremos. **Gráfico A:** Média de leveduras fagocitadas por monócito: não houve diferenças entre os grupos nas fases inicial ($p=0,85$, teste ANOVA) e final ($p=0,97$, ANOVA) dos tratamentos com montelucaste ou placebo. **Gráfico B:** Não houve diferença na proporção de monócitos envolvidos na fagocitose na antes de iniciar o tratamento ($p=0,32$, teste ANOVA). Após 12 semanas de tratamento a proporção de monócitos envolvidos na fagocitose foi menor tanto no grupo

placebo quanto no grupo que recebeu o montelucaste quando comparado ao grupo controle ($p=0,004$, ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls). Entretanto, pela comparação da variação percentual, entre ambos, observamos que a diminuição foi maior para o grupo que recebeu o montelucaste $\Delta\%$, $p=0,04$, teste t não pareado -placebo e montelucaste). **Gráfico C:** Comparação do índice fagocitário dos monócitos entre os grupos antes ($p=0,44$, Kruskal-Wallis) e após o tratamento ($p=0,09$, Kruskal-Wallis).

DISCUSSÃO

A asma é uma doença respiratória comum caracterizada pela obstrução intermitente das vias aéreas e apresenta sintomas como dispnéia, tosse e sibilância causados pela inflamação crônica das vias aéreas e remodelamento. É uma doença heterogênea com muitos subtipos clínicos e vários espectros desde um processo leve e intermitente até um quadro crônico, persistente e grave. Os achados mais característicos da asma envolvem inflamação da via aérea, hiperresponsividade brônquica, excessiva produção de muco e espessamento da parede brônquica (Jacobsen e cols. 2007; Lee e cols., 2007). Os eosinófilos desempenham papel central neste processo inflamatório, sendo atualmente, o alvo de vários estudos no desenvolvimento de terapias para controle da asma.

Neste estudo inédito, avaliamos a influência do tratamento com montelucaste, por 12 semanas, sobre os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos e a capacidade fagocitária de crianças com asma persistente, fora do período de crise.

Análise clínica

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes asmáticos como gênero, idade, peso, estatura, níveis de hemoglobina, eosinofilia periférica, escore de gravidade clínica da asma, nível de controle da doença e valores do PFE não apresentaram diferença entre os asmáticos que iniciaram montelucaste ou placebo, demonstrando homogeneidade no processo de randomização.

Quanto à associação com outras morbidades alérgicas, 86% dos asmáticos do grupo montelucaste e 83% do grupo placebo apresentavam rinite alérgica associada ao quadro de asma. Esta alta porcentagem de associação com a rinite alérgica observada em nossos dados está de acordo com a proposta de vários autores (Sedqwick e cols., 2004; Geller, 2002) sobre o conceito de “via aérea única” e que a rinite alérgica está frequentemente associada à hiperreatividade brônquica, e é geralmente precursora e fator de risco para a asma clinicamente bem estabelecida.

Com relação à melhora clínica dos asmáticos tratados com montelucaste após 12 semanas, não foram observadas acentuadas diferenças com o grupo placebo, no que diz respeito ao número de crises, internações e faltas

escolares. Uma possível explicação seria o fato de ter se tratado de um estudo com crianças e adolescentes com asma persistente e de difícil controle clínico e, portanto, o tempo de tratamento pode não ter sido o suficiente para uma expressão efetiva de melhora da sintomatologia clínica. Entretanto, quando se analisou dados objetivos de melhora como: parâmetros morfológicos do estado de ativação do eosinófilos; redução da eosinofilia periférica e capacidade expiratória pelo pico de fluxo expiratório (PFE) observou-se que o montelucaste foi capaz de gerar melhora significativa nestes parâmetros. Nossas observações foram semelhantes aos achados descritos por Kay (2005) que utilizou anticorpos monoclonais contra IL-5 e conseguiu redução significativa do processo inflamatório e da eosinofilia brônquica comparados com placebo, porém não houve diferença em relação ao grupo placebo quando os pacientes foram questionados sobre melhora clínica. Diferentes achados clínicos foram encontrados por Reiss e colaboradores (1998), que realizaram estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e placebo controlado para analisar os efeitos do tratamento com montelucaste por 12 semanas, em adultos com asma persistente, e encontraram um significativo controle da sintomatologia da asma nos pacientes tratados com montelucaste e decréscimo no número de dias de exacerbações quando comparado ao placebo. Além disso, encontraram diminuição acentuada do número de eosinófilos periféricos quando comparado ao placebo, o que não foi observado por nós. Stelmach e colaboradores (2005) também encontraram melhora clínica nos sintomas, no FEV₁ e acentuado declínio de eosinófilos após 4 semanas de tratamento com montelucaste em crianças asmáticas porém, o estudo inclui crianças com asma leve a moderada, ou seja, com padrão de gravidade menos intenso em relação aos nossos pacientes.

Outro ponto importante e bem estabelecido pela literatura mundial é o efeito placebo. Desde que estudos randomizados, duplo-cego e controlados por placebo tornaram-se o padrão-ouro nas pesquisas científicas, este efeito tem sido estudado. Kemeny e colaboradores (2007) estudaram o efeito placebo na asma, considerando ser esta doença um bom modelo, pois é possível analisar dados objetivos como hiperresponsividade brônquica e a capacidade expiratória dos indivíduos. Observaram que os indivíduos que receberam o placebo apresentaram um terço de resposta na avaliação da

hiperresponsividade brônquica quando comparado com drogas broncodilatadoras, como o salmeterol, em indivíduos com a mesma classificação de gravidade da asma. Wise e colaboradores (2009) compararam o efeito do montelucaste *versus* placebo e observaram que quando o avaliador apresentava o medicamento de forma otimista com frases como “Este medicamento irá resolver sua doença”, a ação do placebo quase se comparava ao do montelucaste na análise de dados clínicos. Outros autores (Busse e Lemanske, 2009; Brown e cols., 2006; Hrobjartsson e Gotzsche, 2001) sugeriram a hipótese que o efeito psicológico que o placebo pode exercer na asma devia-se a ativação da via neural eferente (inibição colinérgica ou ativação não-adrenérgica parassimpática), que pode ter um acentuado efeito broncodilatador. No nosso estudo observamos que dos 41 pacientes asmáticos no grupo que recebeu o placebo, 23 (56%) relataram um percentual de melhora dos sintomas acima de 60%, apesar dos achados laboratoriais não corresponderem à esta melhora sintomatológica. Uma paciente, inclusive, abandonou o tratamento com placebo devido à enxaqueca. Reiss e cols. (1998) também encontraram alguns pacientes em uso de placebo que suspenderam o tratamento devido cefaléia, à semelhança da nossa paciente.

Deve ser considerado ainda que esta melhora ocasionada por um possível efeito placebo dos nossos pacientes pode ter sido devida às particularidades da própria doença, cuja expressão clínica é normalmente cíclica (Global Initiative for Asthma, 2008). Isto ainda significa que para que as diferenças pudessem ser estatisticamente detectadas precisariam ser ainda mais acentuadas para sobrepor o que seria devido apenas às variações da própria doença, detectadas nos indivíduos que receberam o placebo.

Quanto à asma induzida pelo exercício (AIE), todos os indivíduos que utilizaram montelucaste, apresentaram melhora significativa da tosse e/ou da dispnéia aos esforços. De fato, tem sido demonstrado que os níveis elevados de leucotrienos nas vias aéreas têm papel fisiopatológico bem estabelecido neste tipo de asma (Israel e cols., 1999), e a melhora clínica observada por nós nos indivíduos estudados portadores deste tipo de asma estão de acordo com os encontrados por vários outros autores (Kemp, 2009; O`Byrne, 2000; Leff e cols., 1998).

Ativação dos eosinófilos

Avaliamos o estado de ativação dos eosinófilos pela quantificação das alterações nos parâmetros morfológicos destas células, após aderência à lâmina, em crianças e adolescentes com asma persistente, não controlada e no período intercrítico, antes e após 12 semanas de tratamento com montelucaste ou placebo. Com o objetivo de caracterizarmos os parâmetros de normalidade avaliamos crianças controles saudáveis. Analisamos também, o grau de gravidade da asma, com objetivo de verificar se o estado de ativação dos eosinófilos poderia caracterizar a doença e/ou exprimir o comprometimento determinado por sua gravidade e avaliar se o montelucaste influenciaria nestes parâmetros.

Pela análise da ativação dos eosinófilos pelos padrões morfológicos apresentados no teste de aderência à lâmina, observou-se uma menor porcentagem de eosinófilos normais (não ativados) nas crianças asmáticas quando comparadas aos controles saudáveis, ou seja, a grande maioria dos eosinófilos dos indivíduos asmáticos apresentava algum tipo de ativação. Em estudo que analisou os eosinófilos do sangue periférico de crianças asmáticas, Sedgwick e cols. (2004) demonstraram que nos pacientes asmáticos e com rinite alérgica estas células estão presentes em maiores quantidades quando comparado aos controles normais. Além disso, nos indivíduos asmáticos há uma maior concentração sérica de neurotoxina derivada dos eosinófilos, sugerindo maior estado de ativação destas células. Krug e cols. (1999) encontraram uma menor concentração sérica de proteína catiônica eosinofílica e de peroxidase em associação com aumento dos níveis séricos de grânulos dos eosinófilos de pacientes asmáticos, o que sugere que, *in vivo*, ocorre desgranulação de eosinófilos circulantes ativados. Pizzichini e cols. (1997) observaram que os níveis de proteína catiônica eosinofílica também se correlacionavam com o estado de ativação dos eosinófilos, porém com maior sensibilidade quando determinado no escarro induzido do que no sangue periférico. Possivelmente pelo fato de que, os eosinófilos maduros migram da medula óssea para os tecidos, sua presença no escarro seja um parâmetro mais específico da inflamação brônquica (Wilton e cols., 1977).

Analisando comparativamente os pacientes asmáticos e os controles

sadios, antes de iniciar o tratamento, observamos que os parâmetros espraçamento, presença de pseudópodes localizados, presença de grânulos isolados eram mais frequentes nos indivíduos asmáticos, enquanto a degeneração celular era menos frequentemente encontrada nos indivíduos asmáticos do que nos sadios. Marques (2003), estudando crianças asmáticas na vigência da crise, demonstrou que espraçamento, emissão de pseudópodes localizados e generalizados, emissão de grânulos em pequena, moderada e grande quantidade, presença de vacúolos, grânulos isolados e morte celular foram encontrados em maior quantidade nas crianças asmáticas no período de crise (C) quando comparados aos asmáticos no período intercrítico (IC) e controles sadios (S), em ordem de concentração decrescente (C>IC>S). Não foram estudadas as diferenças entre os pacientes no período intercrise e controles sadios, que foi realizado no presente estudo. Nestes dois estudos, o nosso e de Marques, mesmo estudando indivíduos em situações clínicas diferentes, no período de crise e fora da crise asmática, os achados foram semelhantes (espraçamento, emissão de pseudópodes localizados e presença de grânulos isolados), demonstrando a reprodutibilidade da análise morfológica do estado de ativação dos eosinófilos como parâmetro de ativação destas células na asma.

No nosso estudo, os parâmetros que mais se correlacionaram com a gravidade clínica da asma, antes de iniciar o tratamento, foram: espraçamento, presença de grânulos isolados, presença de grânulos em grande quantidade, emissão de pseudópodes localizados e emissão de pseudópodes generalizados, sendo este último o parâmetro mais fidedigno de gravidade entre os pacientes asmáticos, pois foi encontrado em praticamente todos os indivíduos asmáticos. Quanto à gravidade, Marques (2003), encontrou relação significativamente positiva nos seguintes parâmetros: espraçamento, pseudópodes localizados, pseudópodes generalizados, emissão de grânulos em moderada e grande quantidade, presença de vacúolos e morte eosinofílica. É possível que a maior número de parâmetros morfológicos associados com a gravidade nos estudos de Marques (2003) deveu-se ao fato da análise ter sido realizada em crianças com crise aguda de asma e conseqüentemente maior possibilidade de liberação de citocinas e outras substâncias pró-inflamatórias que este processo envolve, potencialmente capazes de promover a ativação

dos eosinófilos.

Os dados sugerem que os parâmetros de ativação dos eosinófilos por nós encontrados possam ser uma expressão do desequilíbrio de citocinas das vias Ta1 e Ta2 nos pacientes asmáticos, com maior produção de IL-5, IL-9, IL-13 (padrão Ta2) (Doherty e Broide, 2007; Bisgaard H, 2003). O montelucaste parece regular esta expressão exacerbada de citocinas da via Ta2, uma vez que eleva, *in vitro*, os níveis de IL-10, que é imunossupressora nos processos inflamatórios alérgicos (Stelmach e cols, 2005) e diminui a expressão de NF- κ B nos tecidos brônquicos (Wu e cols., 2006).

Diferentemente de Marques (2003), encontramos uma menor proporção de eosinófilos em degeneração celular nos pacientes asmáticos. Não é possível caracterizar as causas da degeneração celular ou os motivos de sua diminuição nos indivíduos por nós estudados. Uma provável explicação para este fato seria termos estudado indivíduos que, embora com forma grave de asma, não se encontravam em vigência de crise e nos casos de inflamação crônica, vários estudos demonstraram que a liberação de IL-5 prolonga a meia-vida dos eosinófilos nos asmáticos e diminui a apoptose destas células (Foster e cols, 2008; Lee e cols, 2007; Abadoglu e cols, 2005).

A apoptose é uma forma de morte programada de crucial importância no controle do processo inflamatório. Facilita a ingestão dos eosinófilos intactos pelos macrófagos, prevenindo a liberação dos seus grânulos tóxicos. Vignola e cols. (1999) já haviam demonstrado que o índice de eosinófilos apoptóticos nas biópsias brônquicas de pacientes asmáticos tende a diminuir com o aumento na gravidade clínica. Em 2005, Abadoglu e cols. demonstraram a capacidade do montelucaste para ocasionar apoptose nos eosinófilos brônquicos de adultos com asma persistente leve, após 4 semanas de tratamento. Os corticosteróides também facilitam a apoptose por aumentarem a expressão do FasL nas células epiteliais brônquicas (Drujhe e cols., 1998). Já o fenômeno de necrose celular (degeneração) é o oposto da apoptose, no qual, ocorre lise da membrana celular e liberação de grânulos eosinófilicos, contribuindo para dano tecidual das vias aéreas.

Observamos no nosso estudo que os indivíduos asmáticos têm com maior frequência a presença de grânulos isolados oriundos de eosinófilos no sangue periférico. Além disso, observamos que existe correlação de gravidade

clínica com a presença de grânulos isolados no sangue periférico das crianças asmáticas, fato que provavelmente gera mais dano tecidual e remodelamento na via aérea. Uma possível explicação para a elevada presença destes grânulos seria sua possível exocitose pela desgranulação dos eosinófilos ativado. De fato, a sua relação com a gravidade do quadro clínico corrobora esta hipótese, pois provavelmente, quanto mais grave o quadro clínico, maior o estado de ativação dos eosinófilos. Estranhamente, Marques (2003) não encontrou a presença de grânulos isolados associados à gravidade clínica da asma. Este parâmetro foi observado por nós como um dos fatores de maior intensidade das alterações morfológicas observadas no período intercrítico da asma. Uma possível explicação para a presença destes grânulos seria que eles poderiam representar uma expressão gradual da ativação dos eosinófilos e nas formas da crise aguda da doença, provavelmente pelo intenso grau de ativação do eosinófilo, estes grânulos já tinham sido liberados previamente e por isso não eram mais encontrados na análise das lâminas.

Demonstramos que o montelucaste foi capaz de aumentar o número de eosinófilos normais no sangue periférico de crianças asmáticas após 12 semanas de tratamento, possivelmente devido ao efeito da droga para diminuir o estado de ativação destas células. As nossas observações *in vivo*, podem ser explicadas pelas observações *in vitro*, por Meliton e cols. (2009) da ação do montelucaste modificando a conformação da molécula CD11b, que é essencial para ligação dos LTD₄ ao seu receptor e conseqüentemente podendo influenciar no estado de ativação dos eosinófilos. Pela menor ativação, os eosinófilos permanecem no seu estado normal, tendo menor capacidade tóxica e sendo menos capazes para realizar o processo de migração e adesão. De fato, Ramsay e cols. (2009) demonstraram, *in vivo*, em biópsias brônquicas, que após 6 semanas de tratamento com montelucaste ocorre uma diminuição da expressão de EG2⁺, que é um marcador da ativação dos eosinófilos.

Encontramos um menor percentual de emissão de pseudópodes generalizados, sugerindo diminuição da migração dos eosinófilos após o uso de montelucaste. Isto, provavelmente, deve-se ao fato demonstrado que o montelucaste age como agonista inverso, reduzindo o nível intracelular de fosfatidil-inositol trifosfato e diminuindo o influxo celular de cálcio, que é fundamental para várias funções dos eosinófilos, dentre elas a migração e

emissão pseudópodes (Langois e cols., 2006).

No nosso estudo observamos que o montelucaste também foi capaz de reduzir o número de eosinófilos arredondados após 12 semanas de tratamento. Esta aparência do eosinófilo sugere que esta célula está abarrotada de grânulos no seu interior, mas não está os eliminando. Uma possível explicação seria devida à diminuição do influxo de cálcio no eosinófilo, que também é fundamental para a desgranulação de seus grânulos tóxicos (Langois e cols., 2006; Jayaram e cols., 2005). É possível que o menor influxo de cálcio ocasionado pelo tratamento com montelucaste tenha contribuído para manter a célula intacta. É provável que ocorra um espectro destes parâmetros definido pela gravidade da doença, onde estar arredondado ou espraçado, porém íntegro seja menos grave que a emissão de grânulos pelo eosinófilo, porém mais estudos precisam ser realizados para comprovar esta hipótese.

Outro dado interessante por nós encontrado deve-se a ausência de comunicação dos eosinófilos com outras células nos pacientes sadios e a maior frequência deste parâmetro morfológico nos asmáticos. A associação de corticóide inalatório e montelucaste, neste trabalho, pode ter sido capaz de reduzir este processo, visto que ambos diminuem a quimiotaxia dos eosinófilos (Davis e cols. 2009; Kooi e cols., 2008; Pavord e cols., 2007)

Quanto à ausência de mudança nos outros parâmetros (espraçamento, presença de vacúolos, emissão de grânulos de moderada quantidade) ou redução mais acentuada dos demais parâmetros de ativação dos eosinófilos, é possível que se deva apenas a uma gradação da ação do montelucaste sobre estas células. Há estudos demonstrando que o montelucaste é capaz de diminuir a eosinofilia e o processo inflamatório em pacientes com asma leve e não corticóide-dependente. Jayaram e cols. (2005) realizaram um estudo randomizado, placebo-controlado, crossover e duplo-cego com adultos asmáticos que necessitavam do uso contínuo de altas doses de budesonida inalatória e cursos adicionais de prednisona oral, semelhantes à grande maioria dos nossos pacientes, e introduziram montelucaste ou placebo por 4 semanas para avaliação da eosinofilia periférica e brônquica. Semelhante aos achados do nosso trabalho, os autores não encontraram nenhuma diferença estatística na eosinofilia periférica e brônquica destes pacientes quando comparados ao placebo após 4 semanas de tratamento. Em outros estudos, o montelucaste foi

capaz de diminuir a eosinofilia do escarro, porém estes pacientes não necessitavam de altas doses de corticóide inalado (Tohda e cols, 2002). Achados semelhantes foram demonstrados por Szeffler e cols. (2005), que estudaram crianças asmáticas randomizadas para fluticasona ou montelucaste, na tentativa de compreender a variedade de respostas aos diferentes tratamentos na asma e observaram que crianças com elevados níveis de inflamação eosinofílica na via aérea respondiam menos ao tratamento com montelucaste do que com fluticasona. Uma provável explicação para estes resultados deve-se ao fato que os corticosteróides possuem vários sítios de ação, enquanto que o montelucaste tem ação mais seletiva. Estes dados sugerem que o montelucaste tem mais efeito nos eosinófilos quando utilizado em pacientes com asma leve a moderada.

Não podem ser excluídos os efeitos associados dos corticóides inalatórios e dos broncodilatores de longa ação na terapêutica destes pacientes, porém não poderíamos retirá-los, pois não seria ético pelo fato de que nosso estudo avaliou crianças e adolescentes com asma persistente, para as quais estas drogas são indicadas. Além do que, é pouco provável que um período *washout* tivesse modificado os resultados do nosso estudo, pois o montelucaste se liga seletivamente ao receptor de cys-leucotrieno, alcança o período estacionário em dois dias e tem meia-vida plasmática de 5,3 horas, com efeitos persistindo por até 33 horas (Zhao e cols., 1997) e os corticosteróides não atuam nos receptores cys-leucotrienos (Schleimer e cols., 2010). Estudos anteriores demonstraram que o tratamento prévio com corticóide inalado e/ou agentes β -agonistas de longa ação não alteraram as concentrações dos cysLT no escarro induzido (Hemelaers e cols., 2006). Ademais, alguns estudos demonstraram que a associação do montelucaste com corticóide inalatório em doses menores parece ser mais benéfica do que aumentar a dose do corticóide inalatório para aqueles pacientes com asma persistente não controlada (Barnes e cols., 2007).

Deve ser considerado também o tempo que utilizamos o montelucaste em nosso estudo antes da avaliação do seu efeito. Outro fator importante que deve ser considerado é o tempo de manutenção da melhora dos parâmetros de ativação dos eosinófilos após o término do tratamento com montelucaste. Jayaram e cols. (2005) demonstraram que o montelucaste foi capaz de reduzir a

eosinofilia no escarro após 4 semanas do tratamento, enquanto a fluticasona foi capaz de suprimir esta eosinofilia após 8 semanas, enquanto utilizamos a droga em nosso trabalho por 12 semanas, o que seria suficiente para expressão de sua ação.

Uma limitação do nosso estudo foi não ter investigado outra causa para a eosinofilia do sangue periférico que frequentemente acomete crianças, como parasitose, anterior ao início do projeto. Porém, demonstramos que houve diminuição do número de eosinófilos após o tratamento com montelucaste e nenhuma criança, no período de 12 semanas, foi tratada com antiparasitários, reforçando a possibilidade da eosinofilia periférica ser de origem alérgica.

O teste de aderência à lâmina demonstrou ser capaz de prever a melhora clínica dos pacientes, pois os asmáticos tratados com montelucaste (e não o grupo placebo) apresentaram um maior número de eosinófilos normais, não ativados, e menor frequência de pseudópodes generalizados e grânulos isolados após 12 semanas de tratamento, parâmetros que, no nosso estudo, foram os mais significativos para demonstrar gravidade da asma.

Função dos fagócitos

Apesar de os eosinófilos representarem a principal população responsável pelo processo inflamatório na asma, os monócitos, macrófagos e neutrófilos desempenham papéis importantes neste processo. Estes fagócitos fazem parte da primeira linha de defesa do organismo e a fagocitose está entre os principais mecanismos antimicrobianos, podendo ocorrer de modo dependente como independente de opsoninas (Linehan e cols., 2000).

À semelhança de outras doenças alérgicas, a asma é caracterizada por distúrbios do sistema imunológico e conseqüentes alterações funcionais em várias linhagens de células inflamatórias, dentre as quais, os fagócitos (Kaufman, 1974). Os fagócitos contêm uma NADPH oxidase associada à membrana, a qual produz superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio (radicais livres), responsáveis por atividade microbicida, tumoricida e inflamatória (Henderson e cols., 2006). Durante os processos inflamatórios estes radicais livres constituem fator de risco para danos oxidativos dos tecidos (Sartorelli e cols., 2009; Hung e cols. 2006, Marçal e cols., 2000).

No nosso estudo, avaliamos as funções dos fagócitos, em crianças e adolescentes asmáticos no período intercrítico da doença, pela capacidade que estas células possuem de produzir radicais de oxigênio pelo teste do NBT e pela capacidade de fagocitose por receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (rPMP) e por receptores para opsoninas e o quanto o tratamento com montelucaste é capaz de influenciar estas ações.

Mostramos que, antes de iniciar o tratamento com o montelucaste, os indivíduos asmáticos se comportavam de modo semelhante aos saudáveis quanto ao percentual de fagócitos que reduziam o NBT, basal ou estimulado, porém quando se avaliou o potencial de produção de ânions superóxido, observou-se que os asmáticos reduziam fortemente o NBT, quando comparado aos saudáveis, o que nos sugere uma maior produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos dos indivíduos asmáticos e conseqüentemente, maior potencial para dano tecidual. Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Marçal e cols. (2000) que avaliaram a atividade da NADPH oxidase em granulócitos e células mononucleares de adolescentes e crianças asmáticas segundo a gravidade da doença. Estes autores observaram que a liberação espontânea de ânions superóxido pelos pacientes com asma persistente moderada e grave foi significativamente maior que nos indivíduos com asma leve ou saudáveis. E que nas crianças consideradas graves, mesmo uma hora depois da ativação dos fagócitos, estas células continuavam a liberar radicais de oxigênio em maior proporção que nos indivíduos saudáveis. Nós encontramos resultados semelhantes aos de Marques (2003) que mostrou que as crianças asmáticas, principalmente no período de crise da doença, reduziam o NBT, sem estar fagocitando, em maior proporção do que crianças saudáveis. Grzybowski e cols. (1994) demonstraram que culturas de granulócitos oriundos de pacientes atópicos apresentavam maior potencial de redução do NBT que indivíduos controles saudáveis. Hancock (1997) descreveu o aumento da liberação de superóxido pelos fagócitos de asmáticos, com conseqüente aumento da hiperreatividade brônquica e da permeabilidade vascular, gerando fatores quimiotáticos e de peroxidação lipídica, além da produção de mediadores secundários com efeito broncoconstritor (Hancock, 1997), como os leucotrienos.

O montelucaste, no nosso estudo, após 12 semanas de tratamento, foi

capaz de diminuir o percentual de fagócitos que reduzem fortemente o NBT e aumentar a proporção de redução considerada normal, porém tal fato também foi observado no grupo placebo como um fenômeno natural que foi possivelmente devido ao caráter flutuante da asma, com período intercrítico com crises de exacerbações. Sartorelli e cols. (2009) verificaram que em crianças asmáticas com VEF₁ menor que 60%, indicando asma grave, ocorre aumento da liberação de ânion superóxido e que o tratamento com corticóide inalatório não foi capaz de interferir neste processo, sugerindo que neste grupo de pacientes, semelhante às crianças do nosso estudo, possivelmente os fatores determinantes da manutenção da inflamação também não foram influenciados pelo uso de corticóide inalatório.

Quanto ao processo de fagocitose dos neutrófilos para receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, observamos um menor índice de fagocitose nos indivíduos asmáticos quando comparados aos controles saudáveis. Estas alterações foram resultantes de uma menor participação destas células no processo de fagocitose, possivelmente pela diminuição da quimiotaxia dos neutrófilos dos pacientes asmáticos. Hill e cols. (1975) demonstraram que os níveis elevados de histamina, *in vitro*, são capazes de reduzir a quimiotaxia dos polimorfonucleares. Outra explicação deve-se aos elevados níveis de IgE ou a presença de imunocomplexos bloqueando os receptores de membrana para fatores quimiotáticos dos fagócitos (Ito e cols., 1983). Marques (2003) observou depressão na capacidade fagocitária dos neutrófilos em crianças asmáticas no período crítico, devido ao menor envolvimento dos fagócitos na fagocitose e sugeriu que esta alteração poderia ser resultante do desequilíbrio de algumas citocinas, principalmente o interferon- γ , que é um potente ativador dos fagócitos. Este é produzido pelas células T auxiliar tipo 1 e estimula a aderência, fagocitose, metabolismo oxidativo e produção de óxido nítrico (Borish e Steinke, 2003; Aguayo Maldonado e cols., 1989; Ruiz Extremera e cols., 1984). Em nossos dados, as alterações mais importantes presentes no grupo placebo indicam que o montelucaste não influenciou a fagocitose.

Mostramos que na fagocitose dos neutrófilos pelos receptores para opsoninas, os indivíduos asmáticos não apresentam diferenças dos indivíduos saudáveis e que o montelucaste não ocasionou nenhuma alteração após 12 semanas

de tratamento. Nossos dados foram semelhantes aos encontrados por Grzybowski e cols. (1994) que não observaram diferenças na fagocitose de partículas de látex pelos granulócitos de adultos asmáticos e sadios. Gürer e cols. (2003) demonstraram que o montelucaste aumentou a fagocitose e a capacidade de morte intracelular dos polimorfonucleares de pacientes asmáticos, sugerindo uma importante ação no controle de infecções respiratórias que, na infância, são as principais causas de exacerbações da asma. Diferentemente deste autor, Levy e cols. (2004), não encontraram diferenças na produção de ânion superóxido e na fagocitose de asmáticos tratados com montelucaste por 6 semanas. Um achado interessante deste trabalho foi a elevada produção de superóxido em neutrófilos não estimulados, indicando que estas células estão em constante estado de ativação nos asmáticos.

Na análise dos monócitos, não encontramos diferenças na fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos antes de iniciar o tratamento com o montelucaste. Pela análise da fagocitose pelos monócitos pelos receptores para opsoninas, observamos que o montelucaste foi capaz de reduzir significativamente a proporção de células envolvidas na fagocitose, porém, sem alterar a média de leveduras fagocitadas. Faulkner e cols. (1982), com o objetivo de entender a grande frequência de processos infecciosos em indivíduos asmáticos e a freqüente necessidade de uso de antimicrobianos, investigaram a função dos polimorfonucleares nestes pacientes pelo teste do NBT, quimiotaxia e fagocitose e não observaram diferenças significantes nestes parâmetros em comparação com indivíduos sadios. Os dados da literatura mundial ainda são conflitantes, possivelmente pelo fato de os estudos terem utilizado populações de indivíduos em fases diferentes da doença

Um ponto a ser ressaltado no nosso estudo, é a população estudada, composta por crianças e adolescentes, nos quais a avaliação da asma torna-se prejudicada devida às técnicas atualmente disponíveis.

Em conclusão, nossos dados mostraram pela primeira vez que o montelucaste foi capaz de alterar os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos correlacionados com a gravidade clínica e que este método utilizado para avaliar a ativação dos eosinófilos é acurado, de fácil realização e pode ser um marcador do processo inflamatório da asma e poderia ser utilizado para o

acompanhamento do tratamento de indivíduos com asma.

CONCLUSÕES

Considerando os seguintes resultados obtidos com este trabalho, concluímos que:

1. Na análise clínica, após 12 semanas de tratamento com o montelucaste ocorreu um aumento os valores do pico de fluxo expiratório, sugerindo que ocorreu uma diminuição da inflamação brônquica. O montelucaste diminuiu também o número de eosinófilos periféricos após 12 semanas de tratamento e melhorou os sintomas de dispnéia associado aos esforços nos indivíduos portadores de asma associada ao exercício.
2. Observamos correlação entre o nível de gravidade da asma e o estado de ativação dos eosinófilos do sangue periférico de crianças asmáticas.
3. Os parâmetros que mais se correlacionaram com a gravidade clínica da asma antes de iniciar o tratamento foram: espriamento, presença de grânulos isolados, presença de grânulos em grande quantidade, emissão de pseudópodes localizados e emissão de pseudópodes generalizados, sendo este último o parâmetro mais fidedigno de gravidade entre os pacientes asmáticos.
4. Os parâmetros de ativação do eosinófilos: arredondamento, presença de vacúolos, presença de grânulos em pequena e moderada quantidade e comunicação celular não apresentaram diferenças entre os indivíduos asmáticos e sadios, antes do início do tratamento com o montelucaste.
5. Há um menor número de eosinófilos normais, não ativados, nos indivíduos asmáticos quando comparado às crianças sadias e quanto maior a gravidade clínica da asma, menor o número de eosinófilos normais no sangue periférico.
6. Os indivíduos asmáticos apresentaram um menor número de eosinófilos em fase de degeneração celular quando comparados aos indivíduos sadios, o que sugere que nos asmáticos a meia-vida dos eosinófilos

está aumentada.

7. A avaliação do estado de ativação dos eosinófilos pela análise morfológica das células aderidas à lâmina foi capaz de detectar a melhora nos pacientes asmáticos que utilizaram montelucaste, associado ou não a outros medicamentos, pois neste grupo houve um aumento do número de eosinófilos normais, não ativados, e diminuição do número de eosinófilos arredondados, da presença de grânulos isolados, na emissão de pseudópodes generalizados e na comunicação celular após 12 semanas de tratamento.
8. Os parâmetros morfológicos espriamento, emissão de grânulos em pequena, moderada e grande quantidade, presença de vacúolos, presença de pseudópodes localizados e degeneração celular não apresentaram diferenças estatísticas entre os indivíduos asmáticos tratados com montelucaste ou placebo, após 12 semanas.
9. O uso concomitante de outro medicamento profilático, principalmente corticóide inalatório, quando associado ao montelucaste ocasionou diminuição da presença de grânulos isolados e da comunicação celular.
10. O montelucaste, como monoterapia, foi capaz de aumentar a proporção de eosinófilos normais e diminuir a emissão de grânulos em pequenas quantidades por estas células.
11. Não houve diferença entre os pacientes asmáticos e controles sadios na porcentagem de redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT) basal ou estimulado tanto antes de iniciar quanto ao final do tratamento. Porém quando se comparou o potencial de redução (forte, normal ou fraca) observou-se que os pacientes asmáticos possuíam uma maior força de redução do NBT, sugerindo a geração de radicais de oxigênio em maior quantidade, e que o montelucaste foi capaz de diminuir este parâmetro após 12 semanas de tratamento, porém com comportamento semelhante ao placebo. Nossos dados sugerem que a produção aumentada de radicais de oxigênio nas crianças asmáticas possa estar

contribuindo para as alterações imunopatológicas pulmonares da asma.

12. Quanto à capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, os indivíduos asmáticos apresentaram menor índice fagocitário devido à menor proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose quando comparados aos controles sadios. Após 12 semanas de tratamento os pacientes tratados com montelucaste não mostraram alterações na fagocitose. Os pacientes que utilizaram placebo mostraram acentuada diminuição do índice fagocitário e da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Na fagocitose pelos receptores para opsoninas, não foram encontradas diferenças entre os indivíduos sadios e asmáticos antes e ao final do tratamento e o montelucaste não ocasionou nenhuma alteração neste processo.

13. A capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (rPMP) não mostrou diferença entre os indivíduos asmáticos e controle antes do início do tratamento. O montelucaste comportou-se como o grupo placebo, diminuindo a média de leveduras fagocitadas por monócitos após 12 semanas de tratamento. Quanto à fagocitose pelos receptores para opsoninas somente os asmáticos tratados com montelucaste apresentaram diminuição do índice fagocitário devido diminuição do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose.

14. Neste trabalho demonstramos que o montelucaste foi capaz de alterar os parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos relacionados com maior gravidade clínica na asma. O método utilizado para avaliar a ativação dos eosinófilos mostrou-se acurado, de fácil execução, baixo custo e utiliza pequeno volume de sangue, podendo facilmente ser realizado na prática clínica, principalmente em crianças, pode ser um marcador do processo inflamatório na asma e poderia ser utilizado para o acompanhamento do tratamento de indivíduos com asma. A sua utilização poderá ser mais uma ferramenta no arsenal de

diagnóstico

da

asma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadoglu O, Mungan D, Aksu O, Ereku S, Misirligil Z. The effect of montelukast on eosinophil apoptosis: induced sputum findings of patients with mild persistent asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2005; 33: 105-11.

Ackerman V, Marini M, Vittori E, Bellini A, Vassali G, Mattoli S. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness. *Chest*. 1994; 105: 687-96.

Aguayo Maldonado J, Salmerón Escobar FJ, Bonal Pitz PP, Aguayo Maldonado AL, Loscertales Abril M, Gómez Vida JM, Ruiz Extremera A. Importance of the function of polymorphonuclear neutrophils in intrinsic and extrinsic asthma. Interaction of whole serum in the control of cellular activity. *An Esp Pediatr*. 1989; 30: 435-42.

Aharony, D. Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: S214-8.

Alexis NE, Marlowe WE, Peden DB. Effect of inhaled endotoxin on airway and circulating inflammatory cell phagocytosis and CD11b expression in atopic asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112: 353-61.

Allen DB. Systemic effects of inhaled corticosteroids in children. *Curr Opin Pediatr*. 2004;16: 440-4.

Almirall J, Bolibar I, Balanzo X, Gonzalez CA. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults: a population based case-control study. *Eur Respir J*. 1999; 13: 349-55.

Barnes N, Laviolette M, Allen D, Flood-Page P, Hargreave F, Corris P, O'Connor BJ, Tate H, Parker D, Pavord I. Effects of montelukast compared to double dose budesonide on airway inflammation and asthma control. *Respir Med*. 2007; 101: 1652-8.

Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 183-92.

Batra J, Pratap Singh T, Mabalirajan U, Sinha A, Prasad R, Ghosh B. Association of inducible nitric oxide synthase with asthma severity, total serum immunoglobulin E and blood eosinophils levels. *Thorax.* 2007; 62: 16-22.

Bisgaard H, Zielen S, Garcia-Garcia ML, Johnston SL, Gilles L, Menten J, Tozzi CA, Polos P. Montelukast reduces asthma exacerbations in 2- to 5-year-old children with intermittent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171: 315-22.

Bisgaard H; Study Group on Montelukast and Respiratory Syncytial Virus. A randomized trial of montelukast in respiratory syncytial virus postbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 379-83.

Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111: S460-7.

Brandi MCC. Padronização de um método de obtenção dos fagócitos do sangue periférico para avaliação funcional. Dissertação de Mestrado. Brasília, 1993.

Brown RH, Pearse DB, Pyrgos G, Liu MC, Togias A, Permutt S. The structural basis of airways hyperresponsiveness in asthma. *J Appl Physiol.* 2006; 101: 30-9.

Busse WW, Lemanske RF Jr. The placebo effect in asthma: Far more complex than simply "I shall please". *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124: 445-6.

Campbell DE, Douglas SD. Phagocytic cells functions. I. Oxidation and chemotaxis. In: Rose NR, Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5ª Edição, American Society for Microbiology Press, Washington, 1997; 320-328.

Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Lee SY, McElwain K, McElwain S, Friedman S, Broide DH. Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004; 113: 551-60.

DATASUS [Página na Internet]. Brasília: Ministério da Saúde. 2009. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Data de acesso: 26-06-2008.

Davis BE, Illamperuma C, Gauvreau GM, Watson RM, O'Byrne PM, Deschesnes F, Boulet LP, Cockcroft DW. Single-dose desloratadine and montelukast and allergen-induced late airway responses. *Eur Respir J.* 2009; 33: 1302-8.

Doherty T; Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19: 676-80.

Druilhe A, Wallaert B, Tscopoulos A, Lapa e Silva JR, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Pretolani M. Apoptosis, proliferation, and expression of Bcl-2, Fas, and Fas ligand in bronchial biopsies from asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 19: 747-57.

Dutch Knowledge Center for growth and development in children: Growth Analyser. Disponível em: <http://www.growthanalyser.org/index.php?id=110>. Data de acesso: 02-02-2010.

Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2001. Disponível em: [whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue4/79\(4declaration.pdf](http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue4/79(4declaration.pdf). Data de acesso: 26-06-2008.

Faulkner J, Thompson RA, Morrison-Smith J. Polymorph function in asthma. *Clin Allergy.* 1982; 12: 137-44.

Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH.

Development of spontaneous airway changes consistent in human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. 2002; 295: 336-8.

Foster PS, Rosenberg HF, Asquith KL, Kumar RK. Targeting eosinophils in asthma. *Curr Mol Med*. 2008; 8: 585-90.

Franc NC, White K, Alan R, Ezekowitz A. Phagocytosis and development: back to the future. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11: 47-52.

Geller M. Vias aéreas unidas: a atopia como um processo sistêmico e contínuo. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2002; 25: 74-80.

Global Initiative for Asthma (GINA) updated 2008. Disponível em: <http://www.ginasthma.com/>. Data de acesso: 26-06-2008.

Godfrey S, Kamburoff PL, Nairn JR. Spirometry, lung volumes and airway resistance in normal children aged 5 to 18 years. *Br J Dis Chest*. 1970; 64: 15-24.

Gogate S, Katial R. Pediatric biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide, sputum eosinophils and leukotriene E4. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008; 8: 154-157.

Grzybowski A, Matusiewicz R, Grzybowska K. The migration, phagocytosis and reduction ability of granulocytes from skin infiltrations of patients with atopic asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 1994; 4: 18-22.

Gürer US, Büyükoztürk S, Palandüz S, Gürbüz B, Cevikbaş A. Effect of montelukast on polymorphonuclear leukocyte functions in asthmatic patients. *Int Immunopharmacol*. 2003; 3: 1257-60.

Hakim F, Vilozni D, Adler A, Livnat G, Tal A, Bentur L. The effect of montelukast on bronchial hyperreactivity in preschool children. *Chest*. 2007; 131: 180-6.

Hancock JT. Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules: their production and role in disease. *Br J Biomed Sci.* 1997; 54: 38-46.

Heat H, Qin S, Rao P, Wu L, La Rosa G, Kassan N. Chemokine receptor usage by human eosinophils: the importance of CCR3 demonstrated using antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest.* 1997; 99: 178-184.

Hemelaers L, Henket M, Sele J, Bureau F, Louis R. Cysteinyl-leukotrienes contribute to sputum eosinophil chemotactic activity in asthmatics. *Allergy.* 2006; 61: 136-139.

Henderson WR Jr, Chiang GK, Tien YT, Chi EY. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173: 718-28.

Hill HR, Estensen RD, Quie PG, Hogan NA, Goldberg ND. Modulation of human neutrophilic chemotactic response by cyclic 3'5'- guanosine monophosphate and cyclic 3'5'- adenosine monophosphate. *Metabolism.* 1975; 24: 447-449.

Holgate ST, Peters-Golden M. Introduction: the anti-inflammatory role of cysteinyl leukotriene receptor antagonists in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111: S1-4.

Holloway JW, Beghe B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allergy.* 1999; 29: 1023-32.

Hróbjartsson A, Gøtzsche PC. Is the placebo powerless? An analysis of clinical trials comparing placebo with no treatment. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1594-602.

Hughes JM, Rimmer SJ, Salome CM, Hodge L, Liu-Brennan D, Woolcock AJ, Armour CL. Eosinophilia, interleukin-5 and tumor necrosis factor-alpha in asthmatic children. *Allergy.* 2001; 56: 412-418.

Hung CH, Li CY, Hua YM, Chen CJ, Yang KD, Jong YJ. Effects of leukotriene receptor antagonists on monocyte chemotaxis, p38 and cytoplasmic calcium. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006; 17: 250-8.

Israel E, Drazen JM. Role of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in exercise-induced asthma. In: Mac Fadden E R Jr, Ed. *Exercise-induced asthma*, volume 130. Nova Iorque, 1999, p. 167-80.

Ito S, Shinomiya A, Mikawa H. Suppressive effect of IgE soluble immune complexo on neutrophil chemotaxis. *Clin Exp Immunol.* 1983; 51: 407-12.

IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol*, v. 32, p. S447-S474, nov. 2006.

Jacobsen EA, Ochkur SI, Lee NA, Lee JJ. Eosinophils and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2007; 7: 18-26.

Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA, Lee JJ. Eosinophils: Singulary destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119: 1313-20.

Jayaram L, Duong M, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kamada D, Efthimiadis A, Hargreave FE. Failure of montelukast to reduce sputum eosinophilia in high-dose corticosteroid-dependent asthma. *Eur Respir J.* 2005; 25: 41-6.

Jayaram L, Pizzichini E, Lemièrre C, Man SF, Cartier A, Hargreave FE, Pizzichini MM. Steroid naive eosinophilic asthma: anti-inflammatory effects of fluticasone and montelukast. *Thorax.* 2005; 60: 100-5.

Karr RM, Davies RJ, Butcher BT, Lehrer SB, Wilson MR, Dharmajaran V e cols. Occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1978; 61: 54-65.

Kato M, Nakano M, Morikawa A, Kimura H, Ku-roume T. Ability of polymorphonuclear leukocytes to generate active oxygen species in children with bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* 1991; 95: 17-22.

Kaufman HS, Saffa R. Nitroblue tetrazolium dye tests (NBT) in children with asthma and with selective IgA deficiency. *Ann Allergy.* 1974; 32: 80-5.

Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol.* 2004; 25: 477-82.

Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med.* 2005; 11: 148-52.

Kemeny ME, Rosenwasser LJ, Panettieri RA, Rose RM, Berg-Smith SM, Kline JN. Placebo response in asthma: a robust and objective phenomenon. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119: 1375-81.

Kemp JP. Exercise-induced bronchoconstriction: The effects of montelukast, a leukotriene receptor antagonist. *Ther Clin Risk Manag.* 2009; 5: 923-33.

Kooi EM, Schokker S, Marike Boezen H, de Vries TW, Vaessen-Verberne AA, van der Molen T, Duiverman EJ. Fluticasone or montelukast for preschool children with asthma-like symptoms: Randomized controlled trial. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21: 798-804.

Krug N, Napp U, Enander I, Eklund E, Rieger CH, Schauer U. Intracellular expression and serum levels of eosinophil peroxidase (EPO) and eosinophil cationic protein in asthmatic children. *Clin Exp Allergy.* 1999; 29: 1507-15.

Lachmann PJ; Hobart MJ. Complement technology. In: Weir DM (Ed) *Handbook Experimental Immunology*, volume 1. Immunochimistry. Blackwell, Oxford, 1997. p1-5A.

Langlois A, Ferland C, Tremblay GM, Laviolette M. Montelukast regulates eosinophil protease activity through a leukotriene-independent mechanism. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118: 113-9.

Lee JH, Chang HS, Kim JH, Park SM, Lee YM, Uh ST, Rhim T, Chung IY, Kim YH, Park BL, Park CS, Shin HD. Genetic effect of CCR3 and IL5RA gene polymorphisms on eosinophilia in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: 1110-7.

Leff JA, Busse WW, Pearlman D, Bronsky EA, Kemp J, Hendeles L, Dockhorn R, Kundu S, Zhang J, Seidenberg BC, Reiss TF. Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *N Engl J Med*. 1998; 339: 147-52.

Levy R, Avnun L, Shimonovitz F, Konforty A, Heimer D. Montelukast treatment does not affect peripheral blood neutrophil functions in asthma patients. *Respiration*. 2004; 71: 37-44.

Lima ML, Fraga CAM, Barreiro, EJ. Agentes antiasmáticos modernos: antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos. *Quim Nova*. 2002; 25: 825-34.

Lineham SA, Martinez-Pomares K, Gordon S. Macrophage lectins in the host defence. *Microbes Infect* 2000; 2: 279-288.

Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateauneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*. 1999; 399: 789-93.

Mahapatra P. Social, economic and cultural aspects of asthma: an exploratory study in Andhra Pradesh, India. Institute of Health Systems. 1993.

Malerba M, Ragnoli B, Radaeli A, Tantucci C. Usefulness of exhaled nitric oxide and sputum eosinophils in the long-term control of eosinophilic asthma. *Chest*. 2008; 134: 733-9.

Maneechotesuwan K. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J Immunol.* 2007; 178: 2491-98.

Marçal LE, Rehder J, Condino-Neto A. Atividade da NADPH oxidase em granulócitos e células mononucleares de adolescentes e crianças asmáticas segundo a gravidade da doença. *Rev. bras. alergologia imunopatol.* 2000; 23: 58-65.

Marques SMB. Estado de ativação dos eosinófilos e função fagocitária de neutrófilos e monócitos em crianças asmáticas. Dissertação de Mestrado, Brasília, 2003.

Matsumoto K, Tamari M, Saito H. Involvement of eosinophils in the onset of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 26-7.

Meliton AY, Munoz NM, Leff AR. Blockade of avidity and focal clustering of beta 2-integrin by cysteinyl leukotriene antagonism attenuates eosinophil adhesion. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120: 1316-23.

Meliton AY, Muñoz NM, Osan CM, Meliton LN, Leff AR. Leukotriene D4 activates {beta}2-integrin adhesion in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur Respir J.* 2009; 35: 402-9.

Meyer EH, Dekruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 281-292.

Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. 1996
Disponível em: http://conselho.saude.gov.br/Web_comissoes/conep/index.html
Data de acesso: 26-06-2008.

Monte O. *Endocrinologia para o Pediatra.* 3ª. edição. São Paulo: Atheneu, 2006. pág 429-431.

Muniz-Junqueira MI, Santos Neto L, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor α on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intra erythrocytic *Plasmodium falciparum in vitro*. Cell Immunol, 2001, 208: 73-79.

Muniz-Junqueira MI, Tosta CE, Peçanha LMF, Silva-Filho VL, Cardoso MCA. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2003, 10: 1096-1102.

Nagata M, Saito K. The roles of cysteinyl leukotrienes in eosinophilic inflammation of asthmatic airways. Int Arch Allergy Immunol. 2003; 131: 7-10.

Neffen H, Fritsher C, Schacht FC, Levy G, Chiarella P, Soriano JB. Asthma Control in America Latina: The Insights and Reality in America Latina (AIRLA). Rev Panam Salud Publica. 2005; 17: 191-7.

Nomura A, Kodama T, Morishima Y, Ishii Y, Sakamoto T, Kimura T, Sekizawa K. Cysteinyl leukotrienes and collagen type I synthesis in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2004; 114: 197-9.

Nydegger EU, Anner RN, Gerebtzoff A, Lambert PH, Miescher PA. Polymorphonuclear stimulation by immune complexes. Assessment by *nitroblue tetrazolium* dye reduction. European Journal of Immunology. 1973; 3: 465-470.

O'Byrne PM. Why does airway inflammation persist? Is it leukotrienes? Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161: S186-7.

Pavord I, Woodcock A, Parker D, Rice L; SOLTA study group. Salmeterol plus fluticasone propionate versus fluticasone propionate plus montelukast: a randomised controlled trial investigating the effects on airway inflammation in asthma. Respir Res. 2007; 27: 67-9.

Pearce N, Douwes J. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? J Pediatr (Rio J). 2006; 82: 319-21.

Pease JE. Asthma, allergy and chemokines. *Curr Drug Targets*. 2006; 7: 3-12.

Peters, PS. Leukotriene receptor antagonists in asthma therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111: S62-S70.

Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99: 539-44.

Ramsay CF, Sullivan P, Gizycki M, Wang D, Swern AS, Barnes NC, Reiss TF, Jeffery PK. Montelukast and bronchial inflammation in asthma: a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med*. 2009; 103: 995-1003.

Reiss, TF, Chervinsky P, Dockhorn RJ, Shingo S, Seidenberg B, Edwards TB. Montelukast, a once-daily leukotriene receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma: a multicenter, randomized, double-blind trial. *Arch Intern Med*. 1998; 158: 1213-20.

Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Di Ilio C, D'Orazio N. Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety. *Curr Med Chem*. 2007; 14: 1966-77.

Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 48: 1303-1310.

Rothenberg ME. Eosinophils in the new millennium. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119: 1321-2.

Ruiz Extremera A, Salmeron Escobar FJ, Aguayo Maldonado J, Giron Caro F, Lozano Arrans E, Molina Font JA. Function of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in pediatric patients with intrinsic and extrinsic asthma during the intercrisis period. *Pediatrics*. 1984; 39): 653-60.

Saeki S, Matsuse H, Kondo Y, Machida I, Kawano T, Tomari S, Obase Y, Fukushima C, Kohno S. Effects of antiasthmatic agents on the functions of peripheral blood monocyte-derived dendritic cells from atopic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114: 538-44.

Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax.* 2001; 56: 902-6.

Sampson AP, Pizzichini E, Bisgaard H. Effects of cysteinyl leukotrienes and leukotriene receptor antagonists on markers of inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111: S49-59.

Sandrini A, Ferreira IM, Gutierrez C, Jardim JR, Zamel N, Chapman KR. Effects of montelukast on exhaled nitric oxide and nonvolatile markers of inflammation in mild asthma. *Chest.* 2003; 124: 1334-40.

Sartorelli CF, Rehder J, Condino Neto A, Vilela MM. Assessment of inflammation based on the release of oxygen radicals by granulocytes in chronic uncontrolled asthma. *J Pediatr (Rio J).* 2009; 85: 143-8.

Schleimer RP, Spahn JD, Covar R, Szeffler SJ. Arachidonic acid metabolism. In: Middleton's Allergy Principles and Practice, 2010. Disponível em <http://www.allergytext.com/content/default.cfm>. Data de acesso: 19-01-2010.

Sedgwick JB, Vrtis RF, Jansen KJ, Kita H, Bartemes K, Busse WW. Peripheral blood eosinophils from patients with allergic asthma contain increased intracellular eosinophil-derived neurotoxin. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114: 568-74.

Skerrett SJ. Host defenses against respiratory infection. *Med Clin North Am.* 1994; 78:941-67.

Sigiura H, Komaki Y, Koarai A, Ichinose M. Nitrate stress in refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 355-60.

Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK; ISAAC - Brazilian Group. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. *J Pediatr (Rio J)*. 2006; 82: 341-6.

Stelmach I, Majak P, Jerzynska J, Kuna P. The effect of treatment with montelukast on in vitro interleukin-10 production of mononuclear cells of children with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35: 213-20.

Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 cells. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19: 281-6.

Sukkar MB, Xie S, Khorasani NM, Kon OM, Stanbridge R, Issa R, Chung KF. Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118: 641-8.

Sychlowy A. Allergic asthma and NBT dye reduction by granulocytes. *Allerg Immunol (Leipz)*. 1976; 22: 13-5.

Szeffler SJ, Phillips BR, Martinez FD, Chinchilli VM, Lemanske RF, Strunk RC, Zeiger RS, Larsen G, Spahn JD, Bacharier LB, Bloomberg GR, Guilbert TW, Heldt G, Morgan WJ, Moss MH, Sorkness CA, Taussig LM. Characterization of within-subject responses to fluticasone and montelukast in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 233-42.

Tohda Y, Fujimura M, Taniguchi H, Takagi K, Igarashi T, Yasuhara H, Takahashi K, Nakajima S. Leukotriene receptor antagonist, montelukast, can reduce the need for inhaled steroid while maintaining the clinical stability of asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32: 1180-6.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 825-852.

Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, Gagliardo R, Profita M, Bousquet J, Bonsignore G. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103: 563-73.

Wiesch DG, Meyers DA, Bleeker ER. Genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104: 895-901.

Wilton JM, Renggli HH, Lehner T. A functional comparison of blood and gingival inflammatory polymorphonuclear leucocytes in man. *Clin Exp Immunol.* 1977; 27: 152-8.

Wise RA, Bartlett SJ, Brown ED, Castro M, Cohen R, Holbrook JT, Irvin CG, Rand CS, Sockrider MM, Sugar EA; American Lung Association Asthma Clinical Research Centers. Randomized trial of the effect of drug presentation on asthma outcomes: the American Lung Association Asthma Clinical Research Centers. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124: 436-44

World Health Organization – WHO Antro and macros Version 3. Disponível em: <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>. Data de acesso: 02 de fevereiro de 2010.

World Health Organization. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2001. Disponível em: [whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue4/79\(4\)declaration.pdf](http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue4/79(4)declaration.pdf). Data de acesso: 26-06-2008.

Wu Y, Zhou C, Tao J, Li S. Montelukast prevents the decrease of interleukin-10 and inhibits NF-kappaB activation in inflammatory airway of asthmatic guinea pigs. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006; 84: 531-7.

Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R, Ringler DJ. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma: association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of

eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1997; 27: 3507-16.

Zacharasiewicz A, Erin EM, Bush A. Noninvasive monitoring of airway inflammation and steroid reduction in children with asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006; 6: 155-60.

Zhao JJ, Rogers JD, Holland SD, Larson P, Amin RD, Haesen R, Freeman A, Seiberling M, Merz M, Cheng H. Pharmacokinetics and bioavailability of montelukast sodium (MK-0476) in healthy young and elderly volunteers. *Biopharm Drug Dispos.* 1997; 18: 769-77.

ANEXOS

ANEXO 1

(Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UnB)



ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 023/2009.

Título: “Valor preditivo da evolução dos parâmetros de ativação dos eosinófilos e das funções do sistema de fagócitos na resposta clínica ao montelucaste em crianças asmáticas.”

Pesquisador Responsável: Valéria Botan Gonçalves.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 07/04/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 08/04/2009.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 15/04/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, em reunião ordinária no dia 29/04/2009 conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 04 de Maio de 2009.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UnB

ANEXO 2

**(Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria
Estadual de Saúde do Distrito Federal)**



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 283/2008

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 251/08 – Valor preditivo da evolução dos parâmetros de ativação dos eosinófilos e das funções do sistema de fagócitos na resposta clínica ao montelucaste em crianças asmáticas.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde;


Validade do Parecer: 24/10/2010

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 24 de outubro de 2008.

Atenciosamente.


Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

ANEXO 3
(Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente
Portador de Asma Persistente/ Menor de Idade)

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
ÁREA DE PATOLOGIA, LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR.

PROJETO DE PESQUISA

Influência do montelucaste sobre o estado de ativação dos eosinófilos e a função dos fagócitos em crianças asmáticas.

RESPONSÁVEIS

Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira; Dra. Valéria Botan Gonçalves.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PACIENTE PORTADOR DE ASMA PERSISTENTE/MENOR IDADE)**

Eu,.....,anos, abaixo assinado, pai, mãe ou responsável pelo(a) menor

.....,anos, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

1. Estou participando de minha livre vontade, de uma pesquisa que usa células do sangue do meu filho para um estudo sobre como funcionam com o tratamento ele (a) está recebendo.
2. Serão realizadas duas coletas de sangue: no início do tratamento e após três meses de tratamento.
3. Estou ciente que meu (minha) filho(a) poderá fazer uso de um medicamento que não possui finalidade terapêutica, porém não apresentará prejuízo no tratamento dele (a).
4. Concordo que seja retirado de 1 a 10 ml de sangue de uma veia do braço dele(a), utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.
5. Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado (a) sobre o resultado do exame que será feito no sangue de meu filho(a).
6. Fui esclarecido que o nome dele(a) não será divulgado.
7. Fui esclarecido que se eu não quiser autorizar a participação do meu filho (a) neste projeto, ele continuará o seu tratamento neste Serviço sem prejuízo à sua assistência e saúde.
8. Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com:
 - a) Dra. Valéria Botan Gonçalves - telefone celular: (0xx61)96499911
 - b) Ambulatório de Alergia do HBDF – (0xx61) 33151478.
 - c) Comitê de ética em Pesquisa-telefone: (0xx61)33254955.

Brasília,..... de.....de.....

Voluntário (nome-assinatura ou impressão dactiloscópica)

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

NOME DO PESQUISADOR

Assinatura do pesquisador

OBS: Com cópia para os Pais ou Responsável

ANEXO 4

(Protocolo Clínico de Pesquisa)

PROTOCOLO CLÍNICO DE PESQUISA

Valéria Botan Gonçalves

ORIENTADORA: Profa. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira
COLABORADORES: Dr. Wellington Gonçalves Borges e Dra. Marta Guidacci
Laboratório de Imunologia, Área de Patologia.
Faculdade de Medicina / Universidade de Brasília

1. Identificação:		
Registro no Projeto:	Registro no Ambulatório:	
Data de nascimento: __/__/__	Idade:	Gênero: Fem () Masc ()
Filiação:		
Endereço e telefone:		

2. Critérios de Inclusão:
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Crianças acima de dois anos e adolescentes até 18 anos portadores de asma, atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do HBDF originados de demanda interna ou externa. ➤ Concordância dos pais ou responsáveis em participar da pesquisa, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3. Critérios de Exclusão:
Neoplasias; Diabetes; Síndrome de Down ou outras síndromes genéticas; Doenças de depósitos ou Erros inatos do metabolismo; Doenças da Tireóide; Doença Celíaca; Fibrose Cística; Doenças auto-imunes (ARJ, LES, Dermatomiosite, etc.); Doenças de Base: renal, cardíaca, hepática); Outras doenças pulmonares: intersticiais, displasia broncopulmonar; Tuberculose; Aids; Hipo/Agamaglobulinemia; Doença de Crohn; Uso de imunossupressor.

4. Formas Clínicas Associadas	Dermatite atópica: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Rinite alérgica: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
	Tratamento:	Tratamento:
	Conjuntivite Alérgica <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Tratamento:

Anotações extras (item 04):

5. Classificação Inicial da Gravidade da Asma (IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma, 2006).				
Parâmetros	INTERMITENTE	P. LEVE	P. MODERADA	P. GRAVE
Sintomas diurnos	<input type="checkbox"/> Raros	<input type="checkbox"/> Semanais	<input type="checkbox"/> Diários	<input type="checkbox"/> Diários ou contínuos
Despertar noturno	<input type="checkbox"/> Raros	<input type="checkbox"/> Mensais	<input type="checkbox"/> Semanais	<input type="checkbox"/> Quase diários
β2 alívio	<input type="checkbox"/> Raramente	<input type="checkbox"/> Eventual	<input type="checkbox"/> Diária	<input type="checkbox"/> Diária
Limitação atividades	<input type="checkbox"/> Nenhuma	<input type="checkbox"/> Presente nas exacerbações	<input type="checkbox"/> Presente nas exacerbações	<input type="checkbox"/> Contínua
Exacerbações	<input type="checkbox"/> Raras	<input type="checkbox"/> Afeta atividades e Sono	<input type="checkbox"/> Afeta atividades e Sono	<input type="checkbox"/> Frequentes
VEF1 ou PFE	<input type="checkbox"/> ≥80% predito	<input type="checkbox"/> ≥80% predito	<input type="checkbox"/> 60-80% predito	<input type="checkbox"/> ≤60% predito
Variação VEF1 ou PFE	<input type="checkbox"/> < 20%	<input type="checkbox"/> < 20-30%	<input type="checkbox"/> >30%	<input type="checkbox"/> >30%
OBSERVAÇÕES:				
Classificar o paciente sempre pela manifestação de maior gravidade.				
Pacientes com asma intermitente, mas com exacerbações graves, devem ser classificados como asma persistente moderada.				

6. Nível de Controle do paciente com asma (IV Consenso de Manejo da Asma, 2006).			
Parâmetros	Parcialmente Controlado	Controlado	Não controlado
Sintomas diurnos	<input type="checkbox"/> ≥ 2 vezes por semana	<input type="checkbox"/> Nenhum ou mínimo	2 ou mais parâmetros presentes em qualquer semana.
Despertares noturnos	<input type="checkbox"/> Pelo menos 1	<input type="checkbox"/> Nenhum	
Medicação de resgate	<input type="checkbox"/> ≥ 2 vezes por semana	<input type="checkbox"/> Nenhuma	
Limitação atividades Presente em qualquer momento	<input type="checkbox"/> Presente em qualquer momento	<input type="checkbox"/> Nenhuma	
PFE ou VEF 1	<input type="checkbox"/> $< 80\%$ predito ou do individual	<input type="checkbox"/> Normal ou quase normal	
Exacerbação	<input type="checkbox"/> 1 ou mais por ano	<input type="checkbox"/> Nenhuma	<input type="checkbox"/> 1 em qualquer semana

7. Dados da doença				
Tempo de doença: <input type="checkbox"/> < 1 ano <input type="checkbox"/> 1 a 5 anos <input type="checkbox"/> 6 a 10 anos <input type="checkbox"/> > 10 anos.				
Número de crises no último ano: <input type="checkbox"/> 0 a 3 <input type="checkbox"/> 4 a 7 <input type="checkbox"/> 8 a 11 <input type="checkbox"/> > 11				
Atendimento no PS no último ano: <input type="checkbox"/> nenhum <input type="checkbox"/> 1 a 3 <input type="checkbox"/> 4 a 7 <input type="checkbox"/> 8 a 11 <input type="checkbox"/> > 11				
Internação no último ano: <input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> > 4				
Faltas escolares no último ano: <input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/> 1 a 5 <input type="checkbox"/> 6 a 10 <input type="checkbox"/> 11 a 20 <input type="checkbox"/> > 20				
A asma hoje interfere no seu dia-a-dia: <input type="checkbox"/> muito <input type="checkbox"/> pouco <input type="checkbox"/> nada				

8. Tratamento profilático em uso:	<input type="checkbox"/> Nenhum
Observações adicionais	<input type="checkbox"/> Corticóide inalado
	<input type="checkbox"/> LABA
	<input type="checkbox"/> Imunoterapia

9. Contra-indicações gerais para o dia da coleta:	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Processo infeccioso febril agudo; Estar em crise de asma; Uso de corticóide oral nos últimos quinze dias; Uso de Gamaglobulina nos últimos trinta dias, Vacinas nos últimos quinze dias. 	

10. Data e tipo de Coleta	
1ª Coleta: __/__/__	PFE = _____ Início do montelucaste __/__/_____
Você classifica sua asma em <input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> grave	
<input type="checkbox"/> Hemograma <input type="checkbox"/> Aderência de eosinófilos <input type="checkbox"/> Fagocitose <input type="checkbox"/> NBT	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Classificação Asma: <input type="checkbox"/> AI <input type="checkbox"/> APL <input type="checkbox"/> APM <input type="checkbox"/> APG ➤ OBS (anotar motivo da não coleta ou outras ocorrências): 	
2ª Coleta: __/__/__ PFE = _____ Tempo de uso do montelucaste _____	
<input type="checkbox"/> Hemograma; <input type="checkbox"/> Aderência de eosinófilos; <input type="checkbox"/> Fagocitose; <input type="checkbox"/> NBT; <input type="checkbox"/> Antígeno de superfície; <input type="checkbox"/> Citocinas.	
OBS (anotar motivo da não coleta ou outras ocorrências):	
Teve crise desde a última consulta:	<input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 ou mais
Procurou PS desde a última consulta:	<input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 ou mais
Internação desde última consulta:	<input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 ou mais
Faltas escolares desde última consulta:	<input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/> 1 a 2 <input type="checkbox"/> 3 a 4 <input type="checkbox"/> 5 a 6 <input type="checkbox"/> > 6
Hoje você classifica sua asma em:	<input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> grave
Percentual de melhora:	<input type="checkbox"/> nenhum <input type="checkbox"/> 10 a 40% <input type="checkbox"/> 40 a 60% <input type="checkbox"/> 60 a 80% <input type="checkbox"/> 80 a 90% <input type="checkbox"/> $> 90\%$
A asma hoje interfere no seu dia-a-dia: <input type="checkbox"/> muito <input type="checkbox"/> pouco <input type="checkbox"/> nada	
Classificação Asma: <input type="checkbox"/> AI <input type="checkbox"/> APL <input type="checkbox"/> APM <input type="checkbox"/> APG	

ANEXO 5
(Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Controle
Sadio/ Menor de Idade)

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA.
ÁREA DE PATOLOGIA /LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(CONTROLE NORMAL/MENOR IDADE)

Eu,.....abaixo assinado pai, mãe ou responsável pelo(a) menor, anos, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

9. Estou participando de minha livre vontade, de uma pesquisa que usa células do sangue do meu filho para um estudo sobre como funcionam.
10. Concordo que seja retirado de 1 a 5ml de sangue de uma veia do braço dele (a), uma única vez, utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.
11. Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado (a) sobre o resultado do exame que será feito no sangue de meu filho(a).
12. Fui esclarecido que o nome dele(a) não será divulgado.
13. Fui esclarecido que se eu não quiser autorizar a participação do meu filho (a) neste projeto, a assistência e tratamento que ele(a) está recebendo não serão prejudicados.
14. Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com:
 - a) Dra. Valéria Botan (61) 9649-9911
 - b) Comitê de ética em Pesquisa-telefone: (0xx61) 33254955.

Brasília,..... de.....de.....

Voluntário. (nome-assinatura ou impressão dactiloscópica)

PESQUISADOR

OBS: Com cópia para os Pais ou Responsável

ANEXO 6

(Perfil das crianças e adolescentes asmáticos alocados aleatoriamente no grupo montelucaste)

Anexo 6: Perfil das crianças e adolescentes asmáticos alocados aleatoriamente no grupo montelucaste.

Identificação	Idade	Sexo	Mg	Doenças associadas	Classificação da gravidade	Nível de controle
GTJPB ¹	4	F	4	R	AIE	NC
SBAS ¹	6	F	5	R	PG	NC
CENS ¹	10	M	5	R	PM	NC
AKGL ¹	13	F	5	RC	PM/AIE	NC
AECSP ¹	4	F	4	N	AIE	NC
GLH ¹	9	M	5	RC	PM	PC
TESD ¹	7	F	5	R	PM	PC
LLC ¹	11	M	5	DRC	PL	PC
GHMS ¹	4	M	4	R	PM	PC
WMA ¹	4	M	4	N	PL	PC
ASF ¹	3	M	4	R	PG	PC
NMA ¹	6	F	5	RD	PM	PC
EBS ¹	4	F	4	RD	PL/AIE	PC
JPRF ¹	3	M	5	N	PM	PC
MAGF ¹	5	M	5	R	PG	NC
VLM ¹	5	F	5	R	PM/AIE	PC
RAO ¹	18	F	10	R	PM	PC
LPS ¹	11	M	5	RC	PM/AIE	PC
RAAS ¹	3	M	4	R	PL	PC
LSBA ¹	12	M	5	R	PM	NC
JRFM ¹	10	M	5	R	PM/AIE	PC
ESFM ¹	3	F	4	R	PM	PC
VMRR ¹	10	M	5	O	PG	PC
HLSC ¹	8	F	5	RC	PG	NC
GHMB ¹	4	M	4	R	I	PC
EHMB ¹	6	M	5	R	PL	PC
JAO ¹	4	F	4	R	PL	NC
JAO ¹	4	M	4	R	PM	NC
ACS ¹	11	M	5	RC	PL	PC
NCRG ^{1,2}	10	F	5	R	PM	NC
TRR ^{1,2}	9	F	5	R	PM	NC
ERS ^{1,2}	4	M	4	N	PM	NC
NGSG ^{1,2}	9	F	5	R	PG	NC
BADA ^{1,2}	4	M	4	RC	PG	NC
RGAA ^{1,2}	8	M	5	RD	PG	NC
RSNV ^{1,2}	18	M	10	R	PM	PC
MFOL ^{1,2}	12	M	5	R	PG/AIE	NC
ISM ^{1,2}	13	F	5	R	PG	NC
BAM ^{1,2}	10	M	5	R	PG	NC
GRMS ^{1,2}	6	F	5	R	PG	NC
KYPS ^{1,2}	5	F	5	O	PM	PC
CTP ^{1,2}	12	F	5	R	PM	PC

Sexo: M=masculino, F=feminino; **Formas associadas:** R=rinite, C=conjuntivite, D= dermatite atópica e N= nenhuma; **Classificação da Gravidade:** AIE=asma induzida por exercício, I=intermitente, PL=persistente leve, PM=persistente moderada e PG=persistente grave; **Nível de controle:** NC=não controlada e PC=parcialmente controlada.

¹Indivíduos submetidos à análise morfológica dos parâmetros de ativação dos eosinófilos.

²Indivíduos submetidos à análise da função fagocitária.

ANEXO 7

(Perfil das crianças e adolescentes asmáticos alocados aleatoriamente no grupo placebo)

Anexo 7: Perfil das crianças e adolescentes asmáticos alocados aleatoriamente no grupo placebo.

Identificação	Idade	Sexo	Mg	Doenças associadas	Classificação da Gravidade	Nível de Controle
RVF ¹	6	M	5	R	PL	PC
ATAN ¹	7	M	5	R	PG/AIE	NC
SPS ¹	3	F	4	R	PM	NC
GASB ¹	3	M	4	R	PL	NC
DSS ¹	11	M	5	R	PL	PC
DLMS ¹	8	M	5	R	PM	PC
GRT ¹	3	M	4	N	PM	PC
MCNS ¹	3	F	4	R	PM	PC
DSM ¹	11	M	5	R	PL	PC
VWCS ¹	4	M	4	R	PL	PC
JNL ¹	13	F	5	RD	PL	PC
WSA ¹	9	M	5	RD	AIE	PC
DCSS ¹	3	F	4	R	PL	PC
GMVR ¹	9	F	5	R	PL	PC
SRBR ¹	12	F	5	R	PG	NC
LGAS ¹	8	F	5	R	PM	PC
RVM ¹	3	M	4	R	PG	NC
WLA ¹	5	M	4	R	PM	PC
ANS ¹	13	F	5	RC	AIE	NC
YJSS ¹	7	M	5	R	PG	NC
RGB ¹	14	F	5	R	PM	NC
LRV ¹	5	M	4	DRC	AIE	NC
LSS ¹	9	F	4	RC	PM	NC
DRRS ¹	10	F	5	O	PL	PC
SAL ¹	4	F	5	R	PM	PC
ALVS ¹	8	M	4	RC	PM	PC
JLSF ¹	9	M	5	RC	PM/AIE	PC
PHR ¹	15	M	4	N	PL/AIE	PC
RMOL ^{1,2}	7	M	5	N	PM	NC
JPM ^{1,2}	12	M	5	R	PL/AIE	PC
SNC ^{1,2}	10	F	5	R	PG	NC
MDNS ^{1,2}	11	M	4	R	PM	PC
DBMS ^{1,2}	8	M	10	O	PM	NC
GMS ^{1,2}	9	M	5	O	PM	PC
GC ^{1,2}	3	M	5	R	PM	C
JMA ^{1,2}	3	F	5	R	PM	NC
SGSC ^{1,2}	8	F	5	R	PG	NC
IGC ^{1,2}	8	M	10	N	PG	NC
ACGL ^{1,2}	4	F	5	RD	PG	NC
GGS ^{1,2}	7	F	5	R	PM	PC
GS ^{1,2}	13	M	5	RC	PM	PC

Sexo: M=masculino, F=feminino; **Formas associadas:** R=rinite, C=conjuntivite, D= dermatite atópica e N= nenhuma; **Classificação da Gravidade:** AIE=asma induzida por exercício, I=intermitente, PL=persistente leve, PM=persistente moderada e PG=persistente grave; **Nível de controle:** NC=não controlada e PC=parcialmente controlada.

¹Indivíduos submetidos à análise morfológica dos parâmetros de ativação dos eosinófilos.

²Indivíduos submetidos à análise da função fagocitária.

ANEXO 8

(Perfil das crianças e adolescentes controles sadios)

Anexo 8: Perfil das crianças e adolescentes controles saudáveis.

Identificação	Idade	Sexo
LVM	5	F
LVM	11	M
EVSB	12	M
ESB	9	M
LBPMGS	9	M
JPMS	7	F
LPMS	5	F
LAD	10	F
TMSC	6	M
JLM	5	F

Sexo: M=masculino, F=feminino;

ANEXO 9

(Atlas colorido dos parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos e teste do NBT)

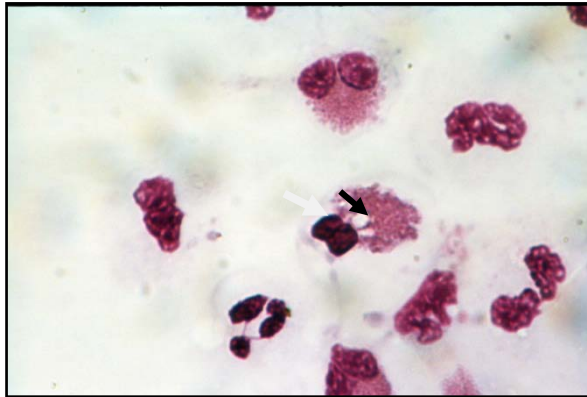


Figura A: Eosinófilo arredondado.
Seta: presença de vacúolos



Figura B: Comunicação celular entre eosinófilos.



Figura C: Eosinófilo espraído.

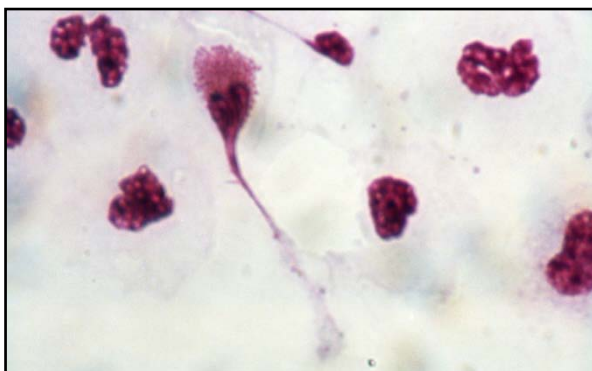


Figura D: Emissão de pseudópode localizado.

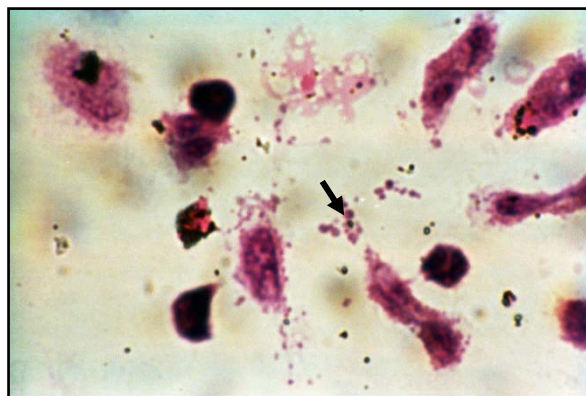


Figura E: Desgranulação intensa.
Seta: Presença de grânulos isolados.



Figura F: Emissão de grânulos em grande quantidade.

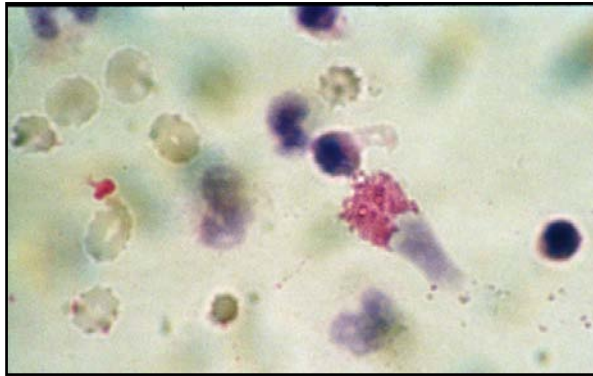


Figura G: Emissão de grânulos em pequena quantidade.

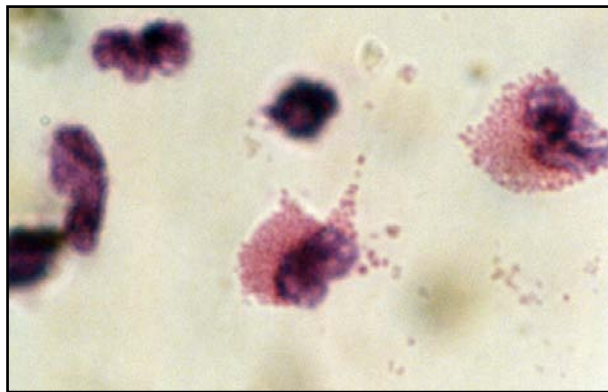


Figura H: Emissão de grânulos em moderada quantidade.

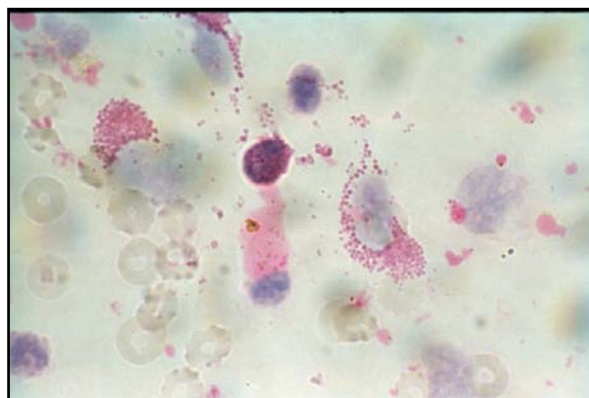


Figura I: Intensa desgranulação. Observa-se grande quantidade de grânulos liberados na lâmina.

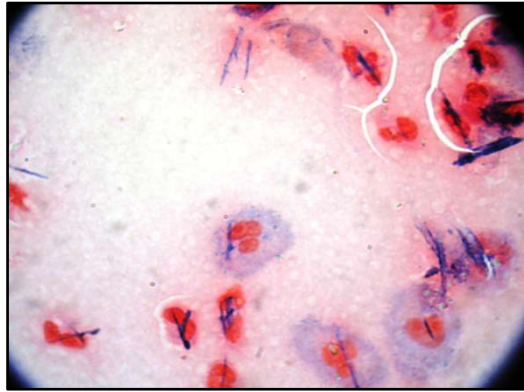


Figura J: Teste do NBT – redução forte. Observa-se a formação de cristais azuis no citoplasma.

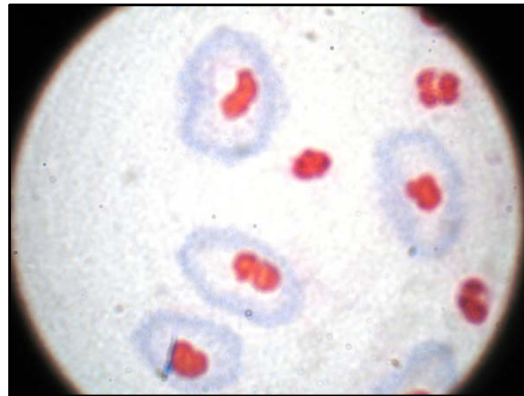


Figura K: Teste do NBT- redução normal.



Figura L: Teste do NBT- redução fraca. Seta: Observa-se pequenos pontos azuis no citoplasma