UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELLA ALVES VENTO

Desenvolvimento de um aparato para a coleta do Condensado do Exalado Pulmonar visando a análise do Óxido Nítrico em indivíduos hígidos.

RIBEIRÃO PRETO-SP
2011

DANIELLA ALVES VENTO

Desenvolvimento de um aparato para a coleta do Condensado do Exalado Pulmonar visando a análise do Óxido Nítrico em indivíduos hígidos.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Mestre**.

Área de concentração: Cirurgia.
Orientador: Prof. Dr. Alfredo José Rodrigues.

RIBEIRÃO PRETO-SP
2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Vento, Daniella Alves
Desenvolvimento de um aparato para a coleta do condensado do exalado pulmonar visando a análise do óxido nítrico em indivíduos hígidos. Ribeirão Preto, 2011.
73 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia.
Orientador: Rodrigues, Alfredo José.

1. Óxido Nítrico. 2. Condensado do Exalado Pulmonar.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniella Alves Vento

Desenvolvimento de um aparato para a coleta do Condensado do Exalado Pulmonar visando a análise do Óxido Nítrico em indivíduos hígidos.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Mestre**. Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em:____/____/____.

Banca Examinadora

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____.
.

Dedico este sonho realizado os meus pais Marisa e Giancarlo Vento e aos meus irmãos Gustavo e Bruno Vento, com amor, admiração e gratidão.

Aos meus avós Leonísia e Paulo Merola e Camélia e Ulisses Vento (in memorian.)

Aos amigos que me acompanham a distância, Louriane, André e Renata, e aos amigos que fiz aqui na USP, Luciana, Livia, Carolina, Julia, Gustavo, Carla, Agnes, Verena, Josy, Dani Nascimento, Marco Túlio, Gabriel, Gustavo Novaes, Luciane Danelon e Viviane.

À **Deus**.

*Aos **meus pais e familiares**, pelo amor e apoio incondicional, credibilidade e incentivo constante, pela força transmitida nos momentos de dificuldade, pela compreensão nos momentos de ausência e pelas possibilidades doadas para conseguir alcançar meus objetivos.*

*Ao **Professor Doutor Alfredo José Rodrigues**, orientador deste estudo, pela disponibilidade, sugestões oportunas, conhecimentos e experiências doadas ao longo do desenvolvimento deste estudo e pela contribuição ao meu enriquecimento ético, profissional e pessoal.*

Em especial, **Lívia Arcêncio,** amiga e colega de profissão que muito contribuiu para a execução deste estudo, pela amizade, companheirismo, apoio incondicional, dedicação e sinceridade nas palavras.

A **Carolina Guimarães Reis**, pela amizade, companheirismo, dedicação, apoio constante e pelas inúmeras vezes em que se dispôs a ajudar e auxiliou na realização das coletas.

A todos os **funcionários e residentes HCRP/FMRP-USP**, que contribuíram direta e indiretamente com o estudo, pela ajuda e compreensão, pelo espírito colaborativo com quem tive o prazer em trocar experiências e saberes díspares.

Em especial, aos **funcionários da Recuperação do Tórax**, pela compreensão e ajuda constante.

Às **secretárias e funcionários** do Departamento de Cirurgia e Anatomia, pela ajuda e apoio na resolução de inúmeras questões.

Às **funcionárias do Laboratório de Bioquímica**, Maria Elisa, Maria Aparecida, Cecília e Clarice pela colaboração e realização das análises do material resultante das coletas deste estudo.
Às funcionárias da **Central de Material do HC-FMRP-USP**, Alexandra, Vanessa, Elaine, Eliana, Viviane e aos demais, pela amizade, carinho e pelo empenho e cuidado em promover a limpeza do nosso material de coleta

Às amigas **Luciana Garros** e **Andrea Carla Celotto** pelo apoio constante e sem restrições, pela amizade e carinho demonstrados a mim durante todos esses anos de convivência.

À **todos os voluntários**, que se disponibilizaram a participar deste estudo, o que tornou possível a realização e concretização de mais um sonho.

Ao **Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** por colocar à disposição a área para realização e desenvolvimento desta e de outras pesquisas.

Ao **CNPq, FAEPA e FAPESP** pelo apoio financeiro.

"*Só posso dizer-lhes uma coisa: aquele que não sabe quem é, não conhece o propósito de sua existência e o seu papel no mundo, a quem está associado e quais são as coisas boas e más, o bonito e o feio, não compreende o discurso, nem a demonstração, nem o que é a verdade, nem o que é mentira, não é capaz de distingui-las, não terá desejos compatíveis com a natureza, não mudará nem crescerá, nem agirá com intencionalidade, nem concordará nem discordará: em poucas palavras, seguirá tolo e cego, pensando que é alguém, quando na verdade não é ninguém*".

Epcteto

RESUMO

VENTO, DA. **Desenvolvimento de um aparato para a coleta do Condensado do Exalado Pulmonar visando à análise do Óxido Nítrico em indivíduos hígidos.** 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-São Paulo, 2011.

O óxido nítrico (NO) tem papel relevante nas diversas funções fisiológicas do organismo e nos mais variados sistemas que o compõe. Sabe-se que esta molécula é um constituinte normal do ar exalado na respiração de humanos e de animais. Tem como funções modular respostas inflamatórias e imunes bem como atuar na regulação do tônus vascular da musculatura lisa das vias aéreas. Esta molécula vem sendo reconhecida como importante marcador de lesão pulmonar, o que despertou a intensa investigação do NO no ar exalado. Uma metodologia não invasiva, de baixo custo e de fácil aplicação está sendo extensivamente estudada para a captação do ar exalado através do seu resfriamento e condensação, denominada Condensado do Exalado Pulmonar (CEP). É grande o interesse no estudo de doenças pulmonares inflamatórias, no entanto, observa-se uma considerável carência de evidências acerca dos níveis de concentração de mediadores inflamatórios, como o NO em amostras de indivíduos hígidos utilizando o CEP. Diante disso, decidiu-se elaborar um protótipo de aparato para coleta do condensado e empregar esta técnica para determinar valores de concentração de NO em uma amostra de voluntários hígidos. A metodologia de coleta utilizada foi baseada nas recomendações da força tarefa da *American Thoracic Society/European Respiratory Society* (ATS/ERS) para procedimentos de coleta de condensado, com o intuito de evitar erros metodológicos, padronizar e trazer mais evidências para auxiliar a inserção do método na rotina clínica, além de disponibilizá-lo para novas pesquisas. Para isto foram selecionados 116 indivíduos adultos hígidos de ambos os sexos, com idade entre 20 e 70 anos. O protótipo de aparato utilizado na pesquisa foi de fabricação artesanal e desenvolvido na Divisão de Cirurgia Torácica e Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- FMRP/USP, visto que os aparatos comerciais são todos importados, de

custo elevado e que ainda não forneceram evidências suficientes de que algum destes seria o *padrão ouro* para a coleta. O aparato foi eficiente para coletar o CEP e o NO foi detectável em todas as amostras. A média de NO foi de 13±14,4µM, e não houve correlação com o gênero (p=0,847) e idade (p=0,811). Não foi observado correlação entre o NO e o volume de CEP coletado (p=0,944). O volume de CEP coletado é dependente do volume exalado total (p<0,001). A partir destes resultados pode-se verificar que o aparato é viável e eficiente. Não foram encontradas correlações entre a concentração de NO no CEP, idade e o gênero. O presente estudo poderá contribuir com futuras pesquisas de caráter comparativo e fornecer mais uma opção de aparato para coleta do condensado do exalado pulmonar, provendo baixo custo, reprodutibilidade e reutilização do aparato.

Palavras-Chave: óxido nítrico; condensado do exalado pulmonar.

ABSTRACT

VENTO, DA. **Development of an apparatus for the collection of Exhaled Breath Condensate in order to analysis of Nitric Oxide in healthy subjects.** 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-São Paulo, 2011.

Nitric oxide (NO) plays an important role in various physiological functions in the body and in various systems that compose it. It is known that this molecule is a normal constituent of exhaled breath in humans and animals. Its functions modulate inflammatory and immune responses as well as act in the regulation of vascular tone of smooth muscles of the airways. This molecule has been recognized as an important marker of lung injury, which sparked intense investigation of exhaled NO. A non-invasive method, low cost and easy application has been extensively studied to collect the exhaled air through its cooling and condensation, termed exhaled breath condensate. There is great interest in the study of inflammatory lung diseases, however, there is a considerable lack of evidence about the concentration levels of inflammatory mediators such NO in samples of healthy individuals using exhaled breath condensate. Given this, it was decided to develop a prototype apparatus for collecting exhaled breath condensate (EBC) and employ this technique to determine concentration values of nitric oxide in a sample of healthy volunteers. The sampling methodology based on the recommendations of the task force of the American Thoracic Society / European Respiratory Society (ATS / ERS) for procedures using for collection of condensate, in order to avoid methodological errors, standardize and bring more evidence to support the inclusion of the method in clinical routine, and make it available for further research. We selected 116 healthy adults of both gender, aged between 20 and 70. The prototype apparatus used in the research was designed, produced and developed in the Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Faculty of Medicine, University of São Paulo-FMRP / USP. The commercial devices are all imported, expensive and not yet provided sufficient evidence that any of these would be the gold standard for collection. The apparatus was efficient to collect the EBC and NO was detectable in all samples.

The average NO was 14.4 ± 13 µM, and there was no correlation with gender (p = 0.847) and age (p = 0.811). There was no correlation between NO and the volume of collected EBC (p = 0.944). The volume of collected EBC is dependent on the total exhaled volume (p <0.001). From these results it can be seen that the apparatus is feasible and efficient. No correlation was found between the concentration of NO in the EBC, age and gender. The present study may contribute to future comparative studies of character and provide another option for apparatus for collecting condensate, providing low cost, reliability and reusability of the apparatus.

Key-words: nitric oxide; exhaled breath condensate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS/ERS: American Thoracic Society/European Respiratory Society

CEP: Condensado do Exalado Pulmonar

cmH_2O: Centímetros de água

cNOS: Óxido Nítrico Sintase Constitutiva

DMP: Discinesia Mucociliar Primária

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelia

FC: Fibrose Cística

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

H_2O_2: Peróxido de hidrogênio

HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

HP: Hipertensão Pulmonar

IECA: Inibidores da enzima conversora de Angiotensina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Indutiva

L/min: Litros por minuto

L: Litros

LBA: Lavado Broncoalveolar

µl: Microlitros

µM: Micromols

ml: Mililitros

N_2O_3: Trióxido de dinitrogênio

N_2O_4: Tetróxido de dinitrogênio

nNOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NO: Óxido Nítrico

NO_2^- :Nitrito

NO_2: Dióxido de nitrogênio

NO_3^- :Nitrato

NOS: Óxido Nítrico Sintase

NOx: Metabólitos do Óxido Nítrico

O_2: Oxigênio

$ONOO^-$: Peróxinitrito

PCARP: Prefeitura do Campus Ribeirão Preto

SARA: Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

SPSS: Statistical Package of the Social Sciences

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

USP: Universidade de São Paulo

VC: Volume Corrente

VE: Volume minuto

VET: Volume Expiratório Total

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Síntese de Óxido Nítrico (NO) pela óxido nítrico sintase (NOS)..... 21

Figura 2- A Foto Rtube. B Esquema Rtube..... 29

Figura 3- Rtube..... 29

Figura 4- Foto Eco Screen..... 30

Figura 5- Eco Screen..... 30

Figura 6- Condensador Anacon Biostec..... 31

Figura 7- Turbo Deccs..... 31

Figura 8- Foto e esquema do Aparato..... 41

Figura 9- Ventilômetro conectado ao tubo ‘U”..... 42

Figura 10- Foto do aparato de Coleta..... 43

Figura 11- Foto de voluntário (modelo) realizando a coleta do CEP..... 43

Figura 12- Analisador de NO Sievers 280i NOA..... 47

Figura 13- Gráficos Q-Q para distribuição de valores de idade (A) e concentração de NO no CEP (b), volume de condensado coletado (C), volume exalado total (D)... 49

Figura 14- Concentração de NO no CEP por faixa etária..... 51

Figura 15- Concentração de NO nos voluntários do gênero masculino e feminino..... 52

Figura 16- Correlação entre a concentração de NO no CEP e idade independente do gênero 53

Figura 17- Volume Exalado total (ml) e CEP coletado por gênero..... 54

Figura 18- Correlação entre o NO e o volume coletado (ml)..... 55

Figura 19- Correlação entre o Volume exalado total e idade (A); Volume de CEP Coletado (ml) e idade (B); Volume exalado total e volume CEP coletado (C)..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratificação das faixas etárias dos voluntários.....39

Tabela 2 - Características da População Estudada 50

Tabela 3 - Valores de concentração de NO (µm).....51

Tabela 4 - Comparação entre os valores de NO no CEP para voluntários femininos e masculinos dentro de cada faixa etária. 52

Tabela 5- Valores de Volume exalado total e volume de CEP coletado.....53

Tabela 6 – Comparação entre os valores de Volume exalado total e volume de CEP coletado dentro de cada faixa etária. 54

Tabela 7 – Comparação do Volume exalado total entre os gêneros para cada faixa etária. 55

SUMÁRIO

1. Introdução..... 19
1.1 Óxido Nítrico..... 19
1.1.1 Biossíntese do Óxido Nítrico..... 20
1.1.2 O Óxido Nítrico e o Organismo..... 22
1.1.3 O Óxido Nítrico e o Sistema respiratório..... 23
1.2 Condensado do Exalado Pulmonar..... 25
1.2.1 Conteúdo do CEP..... 27
1.2.2 Aparatos de Coleta do CEP..... 28
1.3 Estado Atual de coleta e análise do CEP..... 32
2. Objetivos..... 37
3. Materiais e Métodos..... 38
3.1 Voluntários..... 38
3.2 Critérios de exclusão..... 39
3.3 Desenho e Construção do dispositivo para coleta do CEP..... 40
3.4 Procedimento de Coleta..... 44
3.5 Desinfecção do dispositivo de Coleta..... 45
3.6 Mensuração do NO no CEP..... 45
3.7 Análise Estatítica..... 47
4. Resultados..... 49
4.1 Dados demográficos de medidas ventilatórias..... 50
4.2 Óxido Nítrico no Condensado do Exalado Pulmonar..... 50
4.3 Volumes exalado total e condensado exalado pulmonar coletado.. 53
4.4 Efeitos Adversos..... 56
5. Discussão..... 57
6. Conclusão..... 64
Referências..... 65
Anexos..... 70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido Nítrico

Em 1980, como resultado de estudos de fisiologia realizados por Furchgott e Zawadzki[1], destinados a conhecer como se regulava a pressão arterial sanguínea, foi identificado o “fator relaxante derivado do endotélio”, que é produzido pelas células endoteliais e que participa da manutenção do tônus vascular, desempenhando papel preponderante na regulação da pressão sanguínea. Palmer et al[2] sugeriram que o fator relaxante derivado do endotélio e óxido nítrico (NO) eram indistinguíveis na atividade biológica, na estabilidade química e na susceptibilidade à inibidores ou potencialização. E que ambos tinham sua ação inibidas pela hemoglobina e potencializada pela superóxido dismutase. Em 1988, Marleta et al[3] identificou o NO como produto da reação de oxiredução da L-arginina. Anos mais tarde, concluiu ser o NO responsável pela atividade biológica do fator endotelial favorecendo a vasodilatação[4]. Desde então, o interesse por essa molécula cresceu de forma exponencial e, atualmente, de acordo com a *The Nitric Oxide Society,* são publicados a cada ano mais de 3mil artigos científicos sobre o assunto [5-6].

O NO em seu estado natural é um gás com molécula simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades. O fato de apresentar em sua estrutura um radical livre (elétron extra) o torna um agente químico altamente reativo, cujo papel pode ser benéfico ou não, dependendo da concentração. Ademais, atua como um oxidante ou um redutor, o que é ditado pelo meio em que se encontra. No organismo, quando diluído tem meia vida, de menos de 10 segundos, devido a sua rápida oxidação a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Porém esse tempo pode variar entre 3-60 segundos dependendo do conteúdo (por exemplo,

concentração de oxigênio e de superóxido) do meio em que se encontra. Pode ainda se ligar à hemoglobina e outras proteínas que contém o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica[7-10].

1.1.1.Biossíntese do Óxido Nítrico

A biossíntese do NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina, que consiste em um aminoácido que é catalizado e transformado em L-citrulina e, posteriormente, em NO. A catalização é desempenhada pela família de enzimas óxido nítrico sintetase (NOS) [11-12], mas o processo resulta de uma série de eventos de óxido/redução envolvendo inúmeros cofatores. As NOS catalisam a formação de L-citrulina e NO a partir da L-arginina, utilizando o oxigênio e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como co-substratos. E flavina mononucleotídeo (FMN) , flavina adenina dinucleotídeo (FAD), tetraidrobiopterina (BH4), heme, Ca2+/calmodulina e, possivelmente, o zinco como co-fatores, para os quais, há sítios específicos de ligações nas enzimas. Uma molécula mais lábil está envolvida em um passo intermediário (N-hidroxi-L-arginina), requerendo a oxidação de outra molécula de NADPH, antes que a L-citrulina seja produzida com a conseqüente liberação de NO. No entanto, produz-se uma molécula de NO para cada L-citrulina[13], este processo pode ser visto abaixo na figura 1.

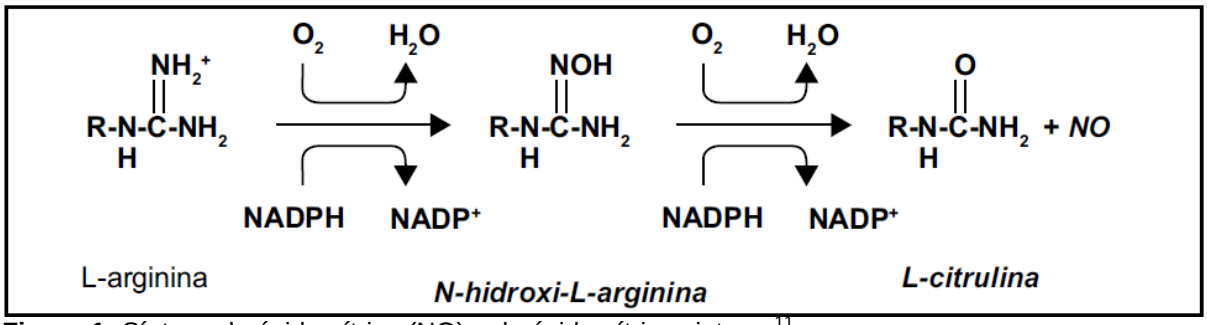


Figura 1- Síntese de óxido nítrico (NO) pela óxido nítrico sintase [11]
Fonte: STANKEVICIUS, E. et al. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. Med, v. 39, p. 4, 2003.

As NOS possuem três isoformas distintas; óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS), a qual engloba a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que normalmente estão presentes nas células endoteliais, e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) presentes em células neuronais. A ativação destas isoformas é diretamente influenciada pela concentração intracelular de cálcio. A ativação da outra isoforma, a óxido nítrico sintase indutiva (iNOS), independe da concentração de cálcio intracelular, sendo a sua ativação realizada por estímulos como, por exemplo, sepse e miocardite e, também, por estímulo imunológico[14]. A atividade desempenhada por tais isoformas é basicamente a produção de NO. Porém, apresentam diferenças em suas estruturas que as permitem localizar-se em sítios específicos e adequados para os mais diversos papéis desempenhados no corpo humano[15].

O NO é o mais potente vasodilatador endógeno conhecido, além de promover inibição da adesão e agregação plaquetária, reduzir a aderência de leucócitos ao endotélio vascular, e suprimir a proliferação de células da musculatura lisa vascular por inibição de fatores de crescimento[16].

Vários produtos podem ser gerados a partir da interação do NO com outros compostos, como por exemplo, a reação com O_2 formando dióxido de nitrogênio (NO_2). Este, por sua vez, pode reagir com outra molécula de NO e produzir trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) ou com o próprio NO_2 (dimerização), gerando tetróxido de

dinitrogênio (N_2O_4). Estas espécies reagem rapidamente com água, formando íons NO_2^- e NO_3^- que são denominados metabólitos do NO (NOx)[17].

1.1.2.O Óxido Nítrico e o Organismo

O NO é reconhecido no organismo humano por suas variadas funções fisiológicas que abrangem os sistemas: cardiovascular, imune, reprodutivo e nervoso, bem como pelo seu papel na hemostasia, configurando a esse mediador gasoso um primordial valor para o funcionamento normal do organismo[6]. Uma característica marcante do NO é que essa molécula, embora desempenhe várias funções fisiológicas, pode ser potencialmente tóxica, dependendo de sua concentração e taxa de depuração tecidual[17].

O NO atua como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo diversas moléculas-alvo, envolvidas em processos tão diversos como a regulação do tônus vascular, controle imunológico da relação patógeno-hospedeiro e neurotransmissão. Todavia, achava-se que o NO não era armazenado *in vivo*, sendo sua produção feita por demanda e difundindo-se rapidamente até o sítio de ação. Há evidências, entretanto, de que o NO pode ser armazenado nos tecidos e no sangue, fato que se deve à reciclagem fisiológica dos íons de NO_2^- e NO_3^- , através da via independente (via exógena) de NOS, que complementa a via dependente (via endógena) de NOS. Desta forma, estes íons são vistos como *pools* de armazenamento de NO nos tecidos e no sangue[17,18-19].

No sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), diferentemente dos demais neurotransmissores, o NO atua sem a necessidade de receptores específicos. No cérebro o NO parece estar envolvido com o aprendizado e formação

da memória. Estudos pós-morte, bem como achados clínicos de modelos experimentais recentes, sugerem o envolvimento do NO na degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson, e, tanto a cNOS quanto a iNOS tem sido implicadas em sua patogênese [14, 20].

No sistema imunológico, os altos níveis de NO produzidos pela iNOS exercem uma potente ação antimicrobiana no controle de infecções. Macrófagos ativados ou infectados produzem altos níveis de NO que se convertem em intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio, tais como O_2^-, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidróxido[21] e peróxinitrito ($ONOO^-$). Estes intermediários são altamente eficazes no combate de vírus, bactéria, protozoários e fungos. Embora altas concentrações de NO sejam benéficas na eliminação de patógenos, a sustentação de altos níveis, ou níveis irregulares de NO, podem ser deletérias para o hospedeiro[22].

1.1.3. O Óxido Nítrico e o Sistema Respiratório

O NO é produzido nas vias aéreas superiores e inferiores (proximais e distais) [23-25]. O sistema respiratório apresenta os dois tipos de isoformas constitutivas, as cNOS (eNOS e nNOS), e a indutiva (iNOS), responsáveis pela produção do NO envolvido em processos fisiológicos e fisiopatológicos. Níveis fisiológicos de NO são produzidos continuamente pelo grupo das cNOS, porém a produção pode ser elevada pelas iNOS nos processos inflamatório.

As isoformas cNOS são encontradas também nas células endoteliais dos vasos pulmonares, as iNOS encontradas nos macrófagos alveolares, e sua expressão é regulada por mediadores inflamatórios. A indução deste isômero é

demorada e a produção de NO só é percebida muitas horas após a exposição ao agente estimulante, porém, uma vez iniciada, perdurará enquanto houver substrato[23, 26-27].

Há participação ativa do NO na regulação da circulação pulmonar, contrabalanceando os mecanismos de vasoconstrição pulmonar, atuando na manutenção do calibre normal da vasculatura pulmonar e dos brônquios, além de ser um vasodiltador potente para a circulação brônquica. Nas cavidades nasais e paranasais o NO atua inibindo a multiplicação de bactérias, vírus, fungos e parasitas, e, aparentemente, também contribui para uma melhora na freqüência do batimento ciliar[24, 28].

Em geral as concentrações de NO produzidas pelas iNOS são altas e estão intimamente envolvidas na patogênese dos processos inflamatórios, nos quais há injúria tecidual. Destarte, parece que o NO tem papel preponderante na fisiopatologia de muitas doenças pulmonares, tais como síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística (FC), asma, hipertensão pulmonar (HP), bronquiectasias, disfunção mucociliar primária (DMP), doenças pulmonares intersticiais entre outras doenças das vias aéreas[28-29].

Uma vez que o NO participa de uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos, refletindo a sua importância na homeostase do organismo, é evidente a necessidade de estudos para se tentar entender de forma mais completa a função desta molécula no organismo e especialmente no trato respiratório[6].

1.2.Condensado do Exalado Pulmonar

Em vista da importância do NO nos processos fisiológicos e fisiopatológicos pulmonares, cresceu o interesse pela monitoração da produção pulmonar de NO mediante a viabilidade da análise da concentração deste mediador no ar exalado de homens e animais. Assim, nos últimos anos a análise da concentração de NO no exalado pulmonar vem se tornando uma ferramenta valiosa no diagnóstico e monitoramento da inflamação das vias aéreas, inclusive para o diagnóstico diferencial com outros processos, bem como para o acompanhamento da severidade das doenças pulmonares e a resposta à terapêutica. Todavia, a coleta e o armazenamento do exalado pulmonar exige aparato especial e grandes volumes de ar devem ser coletados e armazenados em bolsas especiais, tornando o método pouco prático.

Os métodos como lavado broncoalveolar (LBA) e “escarro induzido” foram e ainda são utilizados como formas de obtenção de amostras dos fluidos do trato respiratório, porém, são métodos invasivos e desconfortáveis. Além de proporcionarem riscos e não poderem ser realizados com intervalos curtos de tempo, pois o próprio método pode gerar uma reação inflamatória. Assim, iniciou a procura por técnicas mais simples, não invasivas e rápidas de coleta, armazenamento e dosagem destes fluidos[30-32].

Uma das técnicas recentemente viabilizada foi a monitorização do NO no condensado do exalado pulmonar (CEP) [33], útil não somente para monitorização dos processos inflamatórios das vias aéreas, mas também para o auxílio na possível triagem de indivíduos aparentemente hígidos, com precoces danos no tecido pulmonar[34-35]. Este método foi proposto inicialmente por grupos russos no início dos anos 80, mas obteve reconhecimento através dos trabalhos da equipe de Kharitonov

e Barnes na década de 90. Desde então, cresce expressivamente o interesse de pesquisadores pelo assunto[36-37].

A análise do CEP é um método não invasivo e que consiste basicamente em resfriar o ar exalado pelos pulmões, provocando a condensação do vapor d'água nele contido e que, por sua vez, é coletado para a análise de possíveis moléculas, voláteis e não voláteis encontradas nesse líquido[38], podendo ainda ser armazenado sob refrigeração a temperaturas negativas (-70C), para posterior análise.

O CEP tem sido largamente investigado, por sua utilidade na detecção de mediadores inflamatórios presentes nos fluidos que revestem as superfícies das vias aéreas e com o intuito de analisar o grau de inflamação possibilitando o melhor manejo das doenças respiratórias e adequação da conduta[30, 39]. A coleta do CEP pode ser realizada tanto em indivíduos saudáveis quanto em enfermos, tanto em adultos quanto em crianças. Ademais, pela segurança, simplicidade e conforto o CEP permite a realização de várias coletas num período curto de tempo[40,41].

Assim, a coleta do CEP, pelo fato de não ser invasivo, não é desconfortável e apresenta menos riscos ao paciente, inclusive de contaminação e disseminação de infecções, sendo, portanto, um método mais simples e seguro e que vem ganhando espaço.

1.2.1. Conteúdo do CEP

O conteúdo exalado dos pulmões é composto por uma fase gasosa que contém compostos voláteis, não voláteis e vapor de água. O vapor de água é o principal componente do exalado pulmonar, correspondendo a um volume maior que

99% do fluido coletado, e somente uma parte pequena possui moléculas voláteis e não-voláteis que parecem refletir a composição dos fluidos das vias aéreas[31, 42].

Embora haja predominância de vapor de água no CEP, podemos encontrar os seguintes compostos não voláteis: citocinas, lipídeos, surfactante, íons, produtos de oxidação, adenosina, histamina, acetilcolina e serotonina; e os compostos voláteis: amônia, NO, H_2O_2, etanol e monóxido de carbono[41-42].

O conteúdo do CEP reflete todo o trato respiratório, desde a boca e vias aéreas superiores, até os alvéolos, e ainda não se determinou com precisão qual a contribuição de cada um desses compartimentos na formação e, conseqüentemente, concentração dos biomarcadores presente no CEP, porém se reconhece o NO como um importante marcador de inflamação e lesão pulmonar[24, 43-44].

Ademais, dentre outras moléculas detectadas no CEP, temos o NO_2^- e o NO_3^-, produtos finais estáveis do metabolismo oxidativo do NO em meio aquoso, como visto anteriormente, e que são de grande importância fisiológica e fisiopatológica para o trato respiratório. Embora normalmente sua concentração seja baixa, o aumento de concentração foi observado no CEP de pacientes asmáticos, principalmente durante exacerbações agudas, e de pacientes com outras doenças respiratórias[41, 45].

Assim, a coleta e análise do CEP pode ser utilizada para avaliar e monitorar mediadores inflamatórios, dentre eles o NO_2^- e o NO_3^-, em diversas doenças do sistema respiratório, tais como a asma, DPOC, câncer de pulmão, doenças intersticiais e SARA. Podendo oferecer informações valiosas sobre o estágio e/ou severidade da doença, além de possibilitar a avaliação dos efeitos das terapêuticas empregadas. Recentemente a análise do CEP tem sido utilizada também para a monitoração de trabalhadores expostos ao cobalto e tungstênio, e a análise de

compostos orgânicos halogênicos que podem indicar exposição recente a drogas ou poluentes ambientais[21, 46-47].

Assim, a análise do CEP pode contribuir para o melhor aprendizado sobre a fisiologia do sistema respiratório e os mecanismos fisiopatológicos das doenças pulmonares, através da detecção da presença e alteração da concentração dos marcadores [31].

1.2.2. Aparatos de Coleta do CEP

Até a data da redação dessa dissertação pudemos encontrar quatro aparatos comerciais disponíveis para a coleta do CEP, mas nenhum deles é comercializado no Brasil, são eles: a) o *RTubeTM* (Respiratory Research Inc, Charlottesville, VA, USA - figura 2 e 3), b) o *ECoScreen* (Jaeger, Wurzburg, Alemanha - figura 4 e 5), c) o *Anacon* (Biostec, Valência, Spain - figura 6) e d) o TurboDeccs (Italchil, Parma, Italy - figura 7). Há poucos relatos de estudos envolvendo os dois últimos dispositivos [36, 42].

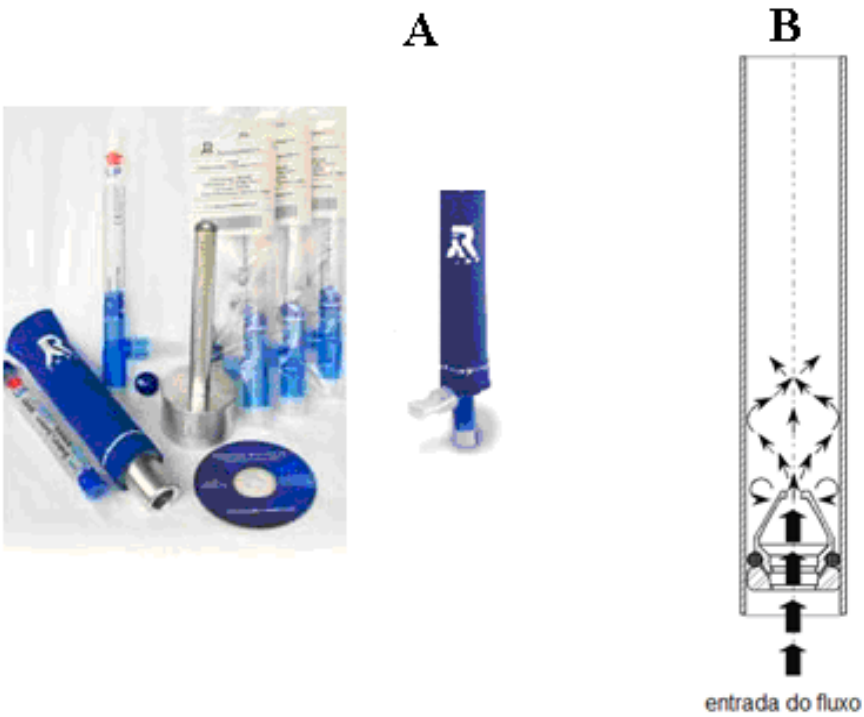


Figura 2-A – Foto R®Tube. B – Esquema R®Tube seccionado (Respiratory Research Inc, Charlottesville, VA, USA).

Figura 3- Foto R®Tube (Respiratory Research Inc, Charlottesville, VA, USA).

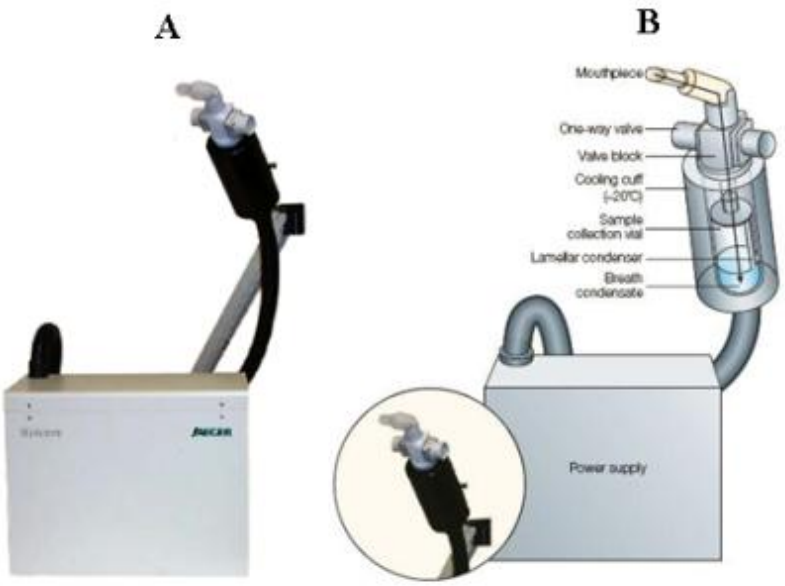


Figura 4- A- Foto EcoScreen ®. Disponível em: viasyshealthcare. B- Esquema funcional do EcoScreen®. In: MONTUSCHI, P. Indirect monitoring of lung Inflammation. Nature, v. 1, p.238-242, 2002. (Jaeger, Wurzburg, Alemanha).

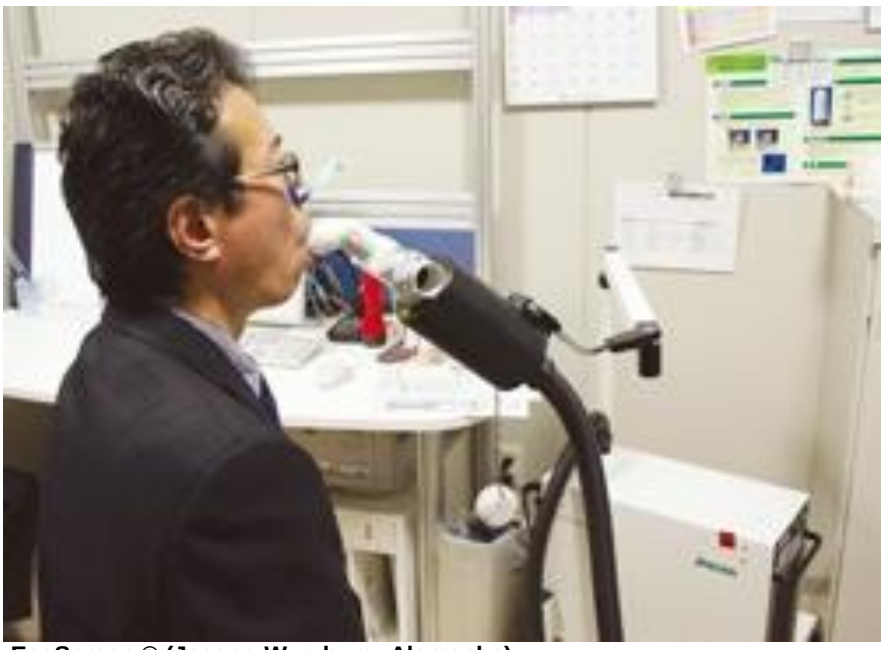


Figura 5- Foto EcoScreen ® (Jaeger, Wurzburg, Alemanha).

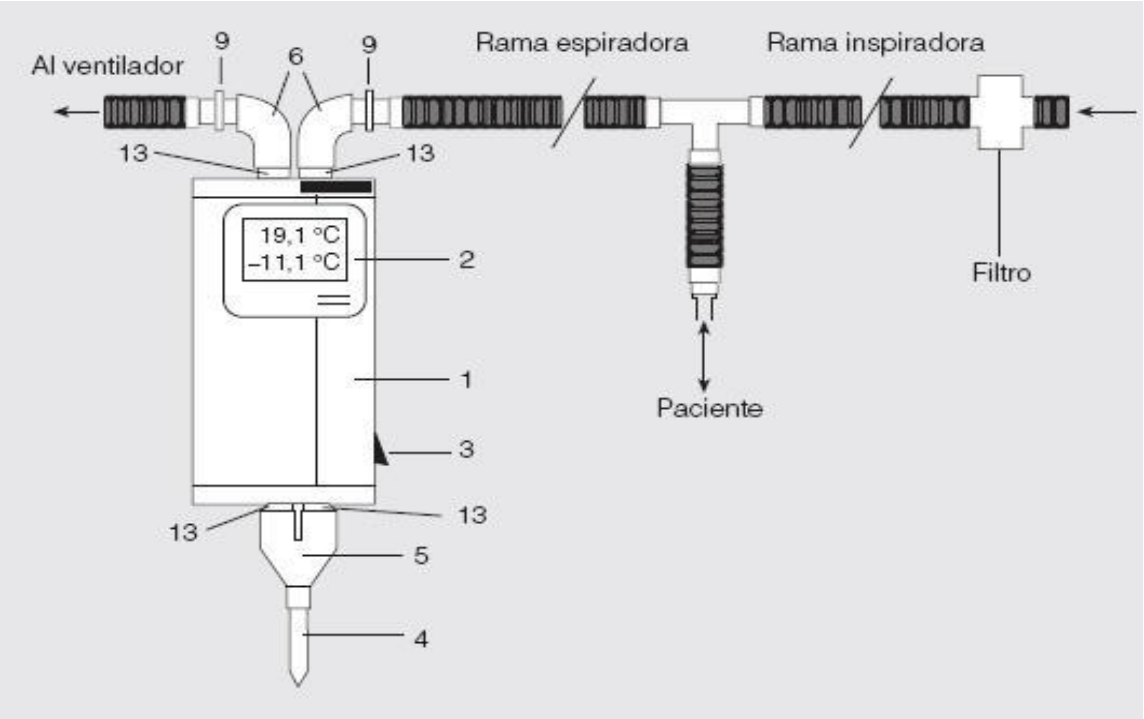


Figura 6- Condensador Anacon Biostec acoplado ao circuito de vetilação mecânica. In: ROMERO, P.V. RODRÍGUEZ, B. MARTÍNEZ, S. CAÑIZARES, R. SEPÚLVEDA, D. MANRESA,.F.. Estrés oxidativo en el condensado exhalado de pacientes con infección pulmonar grave. Arch Bro Arch Bronconeumol, v. 42(3), p.113-9, 2006.

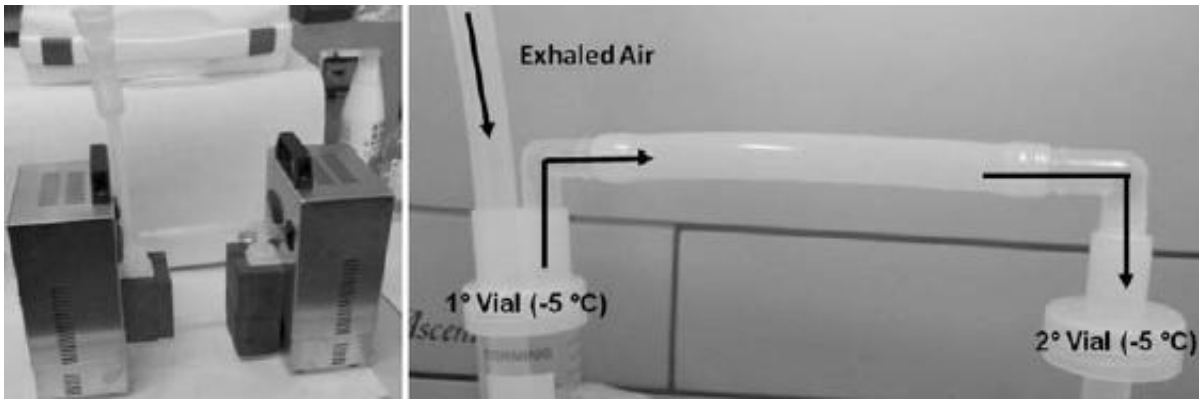


Figura 7- TurboDeccs conectado em série em um estudo de Corradi et al (2008). In: CORRADI, M. GOLDONI, M. CAGLIERI, A. FOLESANI, G. POLI, D. CORTI, M. ANTONIO MUTTI, A. Collecting Exhaled Breath Condensate (EBC) with Two Condensers in Series: A Promising Techniq ue for Studying the Mechanisms of EBC Formation, and the Volatility of Selected Biomarkers. Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery, v. 21 (1), p.35-44, 2008.

Infelizmente, poucos estudos são encontrados na literatura utilizando os aparatos comercialmente disponíveis e mesmo artesanais, que permitiriam avaliar com eficiência, a reprodutibilidade e confiabilidade alguns marcadores de inflamação

pulmonar. Ademais, há também uma carência de estudos acerca de valores de concentração do NO no CEP de indivíduos saudáveis, independente do tipo de aparato utilizado, se comercial ou artesanal[48-49]. Até o momento nenhum dos aparatos comercialmente disponíveis tem superioridade comprovado sobre o outro, ou mesmo tenha se demonstrado superior aos outros para determinado marcador.

1.3 Estado atual da coleta e análise do CEP

A força tarefa da *American Thoracic Society* e *European Respiratoy Society* (ATS/ERS) produziu uma publicação, na qual constam dados a respeito das recomendações metodológicas gerais sobre a coleta e análise do CEP, referindo-se também às questões metodológicas falhas e não resolvidas. Foi produzida com o objetivo de direcionar e padronizar a execução do método, para que haja a formulação e estabelecimento de um consenso a cerca da melhor metodologia a ser empregada [31].

Pelo fato do interesse pela utilização do CEP ser relativamente recente, há necessidade de padronização da coleta, do armazenamento e processamento das amostras, bem como validação da análise dos marcadores em amostras de indivíduos saudáveis, antes de ser considerado na prática clínica [36].

Vários aparatos têm sido utilizados para a coleta do CEP. São elaborados em diferentes formatos e materiais, sendo o teflon e o polipropileno os mais comuns entre os comercialmente disponíveis. O resfriamento têm sido obtido de várias formas, utilizando líquido gelado, ar, metal resfriado ou dióxido de carbono solidificado à -79°C (gelo seco)[41, 50-52].

A recomendação da Força Tarefa da ATS/ERS é de que os equipamentos para a coleta do CEP sejam de material inerte, para evitar a reatividade entre o material e os marcadores coletados, que haja um bocal que evite a contaminação da amostra por saliva, uma válvula unidirecional para prevenir a inspiração do ar resfriado e também para evitar que o condensado entre em contato com o ar ambiente antes ou durante a coleta do CEP [31].

Em geral, o princípio de funcionamento dos equipamentos para coleta do CEP é semelhante. Constituem-se de um sistema, no qual um bocal é conectado a válvulas unidirecionais que direcionam o exalado dos pulmões para um sistema de refrigeração, promovendo a condensação do vapor d'água que, por sua vez, é coletado[36, 42]. O modo de coleta pode influenciar nos níveis dos marcadores. Podemos destacar dois métodos de coleta, por inspiração e expiração via oral, com oclusão das narinas com um clipe nasal e inspiração por via nasal e expiração por via oral sem o clipe nasal. Estudos demonstram que um maior volume de condensado é alcançado quando a coleta é realizada sem o clipe nasal, ou seja, inspirando pelo nariz e expirando pela boca[31]. Todavia, indivíduos portadores de doenças do trato respiratório superior, como a rinite alérgica, podem apresentar coletas com níveis elevados de marcadores, decorrentes da contaminação do ar que passa por estes condutos ao ser inspirado [31, 53].

Nas coletas realizadas via inspiração e expiração oral, há a possibilidade de contaminação da amostra por moléculas presentes na boca, sobretudo na saliva. Por este motivo, sugere-se que os indivíduos a serem avaliados realizem um enxágüe bucal com água antes da coleta e sejam instruídos a engolir a saliva acumulada numa tentativa de minorar a contaminação.

Ademais, recomenda-se que haja no dispositivo um coletor de saliva, diminuindo a contaminação da amostra [45, 54-55]. Dentre outras recomendações

recentes quanto à execução das medidas ventilatórias, estão o encorajamento do indivíduo para respirar normalmente, evitando hiperventilação e que se remova o coletor da boca durante uma tosse ou eructação [50].

O volume do condensado e o comportamento de alguns marcadores parecem ser dependentes do padrão de fluxo respiratório. Estudos mostram que há relação significante entre o volume minuto (VE), o volume corrente (VC) e o volume coletado do CEP em ambos os indivíduos, saudáveis ou portadores de obstruções de vias aéreas[56]. Portanto, levando-se em conta estas possíveis alterações decorrentes da variação do fluxo aéreo é desejável que os sistemas de coleta permitam a mensuração dos parâmetros ventilatórios. Porém não há dispositivos atualmente fabricados com esse sistema de mensuração integrado, há no mercado um equipamento denominado EcoVent que pode ser acoplado ao dispositivo comercial Ecoscreen possibilitando as mensurações dos parâmetros ventilatórios [36].

Pouco se sabe acerca da influência da temperatura e umidade do ar exalado nas mensurações do CEP, porém existem relatos de que esses dois fatores podem afetar o volume da amostra [42, 56]. A temperatura durante a coleta do CEP deve ser de aproximadamente -7ºC. As amostras devem ser imediatamente congeladas após a coleta e armazenadas a uma temperatura de até -70˚ C. É importante não haver múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento, pois isto pode destruir certos tipos de mediadores. Considerando que os marcadores são estáveis quando armazenados nessas condições, após um longo período de armazenamento alguns podem tornar-se instáveis [31].

No que diz respeito à dosagem de concentração do NO, é necessário o preparo prévio das amostras. A análise pode ser realizada atráves do método de quimioluminescência NO/ozônio, utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, EUA) ou a técnica de reação

de Griess[50]. Parte da variabilidade das concentrações dos marcadores no CEP pode ser devido aos métodos de análise e armazenamento, por essa razão é necessário validar uma metodologia de análise eficaz, confiável para cada marcador e que não influenciará em suas concentrações [39].

A partir do levantamento realizado, percebeu-se que o CEP pode ser um método que tem muito a contribuir com a prática clínica, facilitando o manejo das doenças respiratórias. Para que este método seja inserido na rotina clínica, torna-se necessário a padronização da técnica de coleta, bem como a validação dos níveis dos marcadores em indivíduos hígidos, para que possa haver valores de parâmetro que poderão ser utilizados na comparação dos níveis encontrados na população doente.

Poucos estudos foram encontrados utilizando condensadores fabricados artesanalmente, porém há relatos de eficácia e reprodutibilidade na utilização destes condensadores [52, 57-58]. Todavia, não há evidências que apontem qual o melhor tipo de condensador a ser utilizado. Apesar disso, não existem vantagens sobre a funcionalidade daqueles feitos de forma artesanal, exceto o fato de que os aparatos comerciais possibilitam o congelamento imediato das amostras[42]. Uma vez que esses aparatos não estão disponíveis para venda no Brasil, há a necessidade de importá-los, o que eleva consideravelmente os custos, desmotivando a inclusão do método na prática clínica em nosso meio.

Portanto, como dito anteriormente, há a extrema necessidade de se identificar os valores de referência para os diferentes tipos de marcadores, em especial o NO em diversas condições patológicas e em indivíduos hígidos, mediante estudos contendo tamanho amostral apropriado. É necessário também, o reconhecimento de fatores metodológicos que possam interferir na coleta e concentração dos marcadores de interesse. Assim, pela simplicidade e em havendo aparatos viáveis, o

método tem potencial para a realização de estudos que verifiquem uma possível correlação dos marcadores presentes no CEP, dentre eles o NO com os sintomas e a função pulmonar, além de possibilitar a identificação do perfil das biomoléculas nas diferentes doenças pulmonares[39, 49].

Por esses motivos, e, pelo fato de que esse método com aparatos de fabricação artesanal funciona adequadamente, podendo ser muito útil no manejo do paciente portador de doenças respiratórias, decidiu-se pela elaboração, confecção e teste de um aparato de baixo custo, reutilizável e de confecção reprodutível idealizado na Divisão de Cirurgia Cardiovascular e Torácica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, com o intuito de disponibilizar mais uma opção que seja, entre as outras vantagens, confiável para a coleta do CEP e dosagem de NO.

2. OBJETIVOS

- Elaborar, confeccionar e testar o desempenho de um aparato de baixo custo e reutilizável para a coleta do condensado do exalado pulmonar.
- Verificar a concentração de óxido nítrico no condensado do exalado pulmonar utilizando-se o aparato proposto em diferentes faixas etárias de uma amostra de voluntários saudáveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O aparato foi idealizado pelos pesquisadores, e o estudo, conduzido na Divisão de Cirurgia Cardiovascular e Torácica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – FMRP/USP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, processo HCRP nº 4167/2009.

Os voluntários foram esclarecidos quanto a sua participação, os riscos e benefícios envolvidos, leram e assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE).

3.1.Voluntários

Cento e dezesseis voluntários saudáveis, de ambos os sexos e com idade entre 20-70 anos foram recrutados e alocados em grupos estratificados de acordo com a faixa etária, conforme demonstrado na quadro 1. Participaram da pesquisa funcionários do hospital, estudantes e acompanhantes de pacientes.

Os dados demográficos foram coletados mediante um questionário (anexo 1), com o intuito de identificar possíveis fatores que se possam estar associados a alterações dos níveis de NO no CEP.

Quadro 1 - Estratificação das faixas etárias dos voluntários

Grupo	Faixa Etária
G1	20-30 Anos
G2	31-40 Anos
G3	41-50 Anos
G4	51-60 Anos
G5	61-70 Anos

3.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os indivíduos que se recusaram a participar e/ou assinar o TCLE, ou que apresentavam um ou mais fatores descrito a seguir:

- História de qualquer doença pulmonar e/ou sistêmica;
- História de exposição constantemente a formaldeido e ozônio;
- Uso de medicamentos como Enalapril (Inibidores da enzima conversora de angiotensina – IECA), Sildenafil, corticosteróides e Oximetazolina;
- Ingestão de alimentos ou bebidas 2 horas antes da coleta do CEP e consumo de bebida alcoólica nas últimas 24 horas;
- Tabagismo;
- Prática de exercício físico vigoroso nas últimas 24 horas.

3.3 Desenho e Construção do Dispositivo para Coleta do CEP

O aparato idealizado para a realização da coleta do CEP (figura 8) segue o princípio de funcionamento dos dispositivos comerciais, e foi confeccionado artesanalmente na Oficina de Precisão de Materiais da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto (PCARP-USP), em vidro, por ser considerado material inerte e pouco dispendioso.

Trata-se de um tubo confeccionado com vidro do tipo borosilicato (Duran® Schott-Rohrglas, Mitterteich, Germany), que é fabricado a partir de areia de quartzo, óxidos de boro, alumínio, potássio e sódio, e atualmente também fabricado de vidro reciclado. Por possuir um baixíssimo coeficiente de dilatação é resistente a grandes choques térmicos.

O tubo de vidro possui 18 mm de espessura, tem forma de “U” com as extremidades distais abertas horizontalizadas. O comprimento interno total de ponta a ponta é de 53,5cm e o externo de 63,5 cm. Com exceção das extremidades distais horizontais o tubo em “U” possui 42 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento de cada lado. As partes horizontais desse “U” possuem um diâmetro de 22 mm e comprimento de 5 cm. Na parte inferior do tubo há um outro, também de vidro, com junta 14/20, ou seja, com 14 mm de espessura por 20 mm de diâmetro e comprimento de 5 cm. A extremidade aberta é conectada a um encaixe confeccionado em resina Teflon® (Polifluor, São Paulo, Brasil), para escoamento do condensado para um microtubo de polipropileno com capacidade de 1,5 ml (Axygen Inc.,Union City, California, EUA), onde foi armazenado o condensado durante a coleta.

O tubo em “U”, com exceção das extremidades horizontais abertas, e o coletor ficam totalmente envoltos por em gelo picado ao qual se adicionou sal e acondicionado em recipiente de isopor durante todo o período de coleta do CEP. A

uma das extremidades abertas do Tubo de vidro se conectam, mediante conector de silicone, um dispositivo formado por válvulas unidirecionais (válvulas de exalação do respirador mecânico BIRD Mark 7®) conectadas a um bocal de plástico. As válvulas e o bocal são dispostos de forma a permitir que o ar inspirado venha do meio externo e todo o expirado seja direcionado para o tubo de vidro em “U” envolto em gelo (figura 8B). A extremidade oposta do tubo de vidro (Figura- 9A) foi conectada a um ventilômetro digital (DHD Healthcare) com o objetivo de se obter dados sobre os valores de volume minuto e volume corrente durante a coleta CEP. O posicionamento do ventilômetro à extremidade oposta do tubo de vidro tem o intuito de garantir que ele não influencie diretamente o coletado.

A

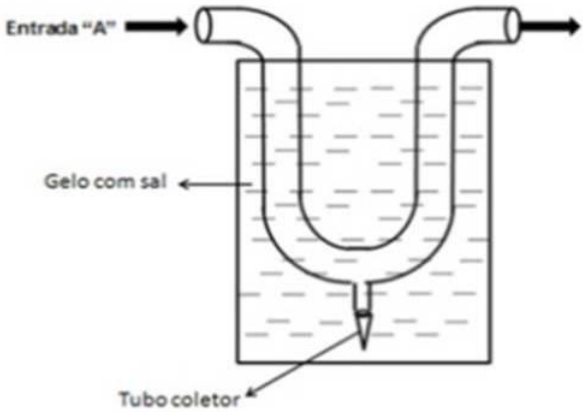
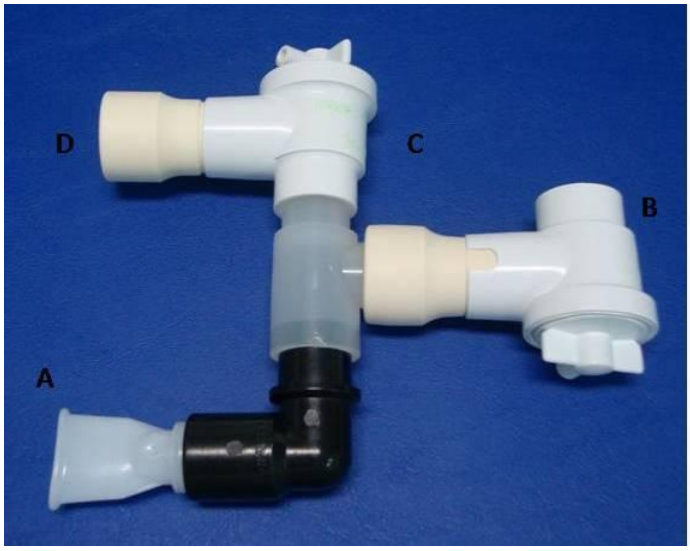
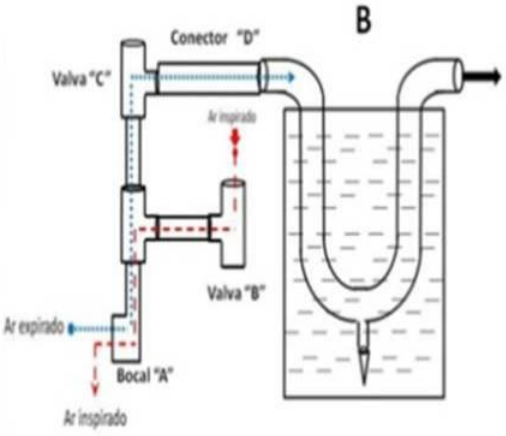


Figura 8 – Foto e esquema do Aparato. A Fotografia e esquema do tubo de vidro condensador em forma de “U” com a aberturas laterais para entrada e saída do fluxo de ar e coletor do CEP conectado na abertura inferior do condensador. B: Fotografia e esquema do aparato para coleta do CEP. a: bocal. b: válvula inspiratória. c: válvula expiratória. d: local de conexão do coletor de vidro





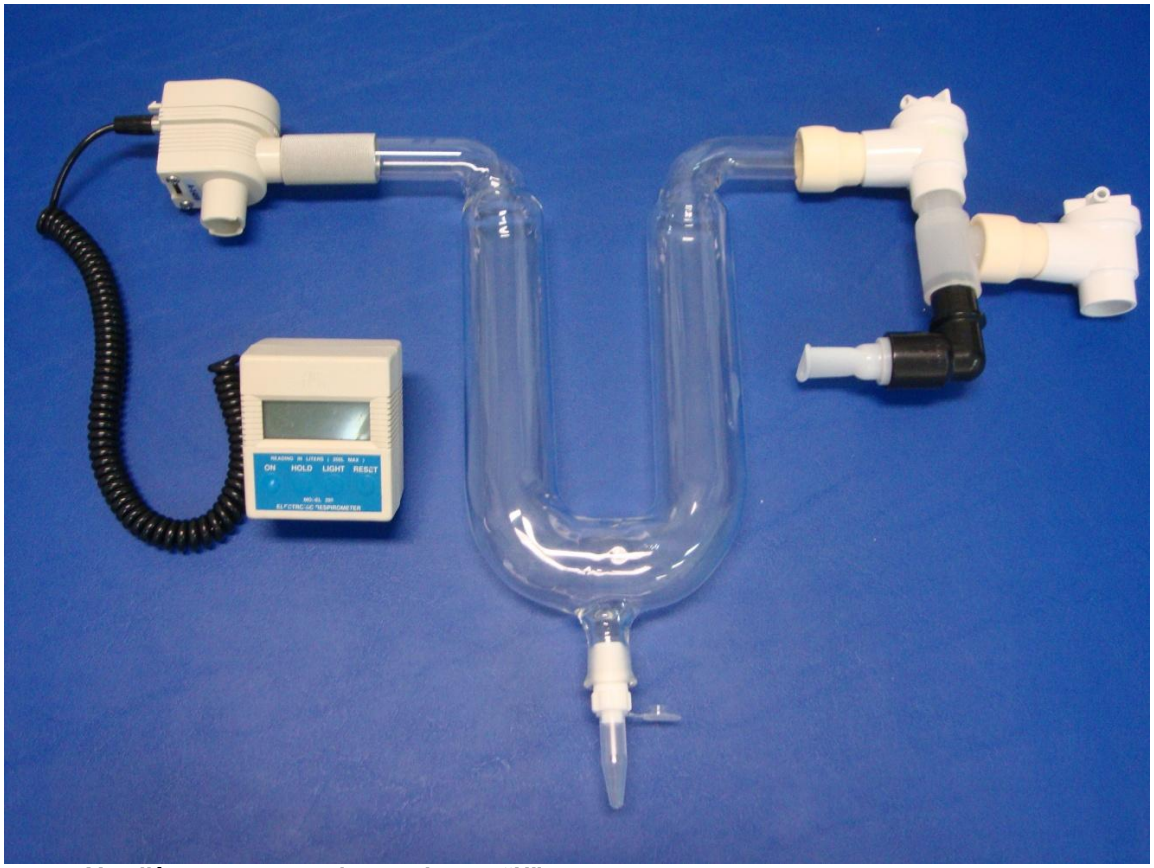


Figura 9- Ventilômetro conectado ao tubo em "U";

Figura 10- Aparato de coleta

Figura 11 - Foto de voluntário (modelo) realizando coleta do CEP.

3.4. Procedimentos de Coleta

As coletas foram realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, de acordo com as recomendações da American Thoracic Society (2006) e da Força Tarefa entre a American Thoracic Society e a European Respiratory Society (2005).

Antes do início da coleta o voluntário recebeu instruções e informações sobre o procedimento de coleta. A seguir, foi solicitado ao voluntário realizar um enxágüe bucal com água e permanecer sentado, em repouso, por 5 minutos. Realizou-se um ensaio com o dispositivo de válvulas sem o aparato conectado, para que o voluntário se familiarizasse e para que possíveis erros fossem corrigidos e evitados. Neste momento foi mensurado o volume minuto, através do ventilômetro conectado ao dispositivo.

Após esse ensaio o voluntário aguardou mais 5 minutos antes de iniciar a coleta propriamente dita. Certificou-se de que o bocal estava bem acoplado e o clipe nasal posicionado corretamente. O voluntário foi orientado a respirar normalmente pelo bocal do aparato durante 10 minutos. Caso o voluntário apresentasse sinais e sintomas como tontura, mal estar, dispnéia ou qualquer desconforto durante a execução da coleta, a mesma era interrompida.

O condensado, coletado no microtubo de polipropileno, foi mantido acondicionado em gelo (-7˚ C) e foi transportado para ser estocado em freezer a -70˚C para posterior análise.

3.5. Desinfecção do Dispositivo de Coleta

Todo o material em contato direto com o voluntário, válvulas, tubos e conexões, eram encaminhados à Central de Materiais do Hospital das Clínicas FMRP/USP para limpeza e esterilização.

As peças constituídas de material plástico, silicone e teflon foram inicialmente lavadas com água e sabão e, depois, mergulhadas em solução de ácido peracético Anioxyde 1000 (Anios, Pavê Du Moulin, Lille, França), com concentração de 1471 ppm por 30 minutos. Finalizado este procedimento, as peças eram enxaguadas abundantemente com água, para eliminar resíduos do ácido peracético, e secas. A seguir foram acondicionadas em saco plástico lacrado até a utilização.

O tubo de vidro em “U” era lavado em água corrente seguida por lavagem em água destilada, deionizada e ultrafiltrada (Milli-q). Após estes procedimentos, o tubo era encaminhado à Central de Materiais do HC- FMRP/USP para esterilização na Autoclave HI VAC (Baumer AS, Mogi-Mirim, São Paulo, Brasil), a uma temperatura de aproximadamente 130ºC por 45 minutos. Posteriormente, era acondicionado em tecido de algodão ou em tecido SMS constituído de propileno 100%.

3.6. Mensuração do NO no CEP

A técnica empregada para mensuração no NO foi a quimioluminescência. A detecção do NO é baseada na observação da interação do ozônio com o NO para gerar luz. Esta luminescência gerada é mensurada por um tubo sensível fotomultiplicador e é diretamente proporcional aos níveis de NO[9]. A análise é realizada no aparelho Nitric Oxide Analyzer 280i NOA (Sievers, Boulder, CO, EUA)

(figura 10), do Laboratório de Função Endotelial do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP.

O primeiro passo para a dosagem consta de uma etapa que consiste no processo de desproteinização por incubação com etanol absoluto (4ºC), depois são mantidas por 30 minutos em freezer (-20ºC), e, em seguida, centrifugadas a 4000 rotações por minto (RPM) por 10 minutos em centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Alemanha). Posteriormente, das amostras desproteinizadas, tomou-se de 5 microlitros (µl) que foi injetado na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de ácido clorídrico à 95ºC) que converte o NO_2^- + NO_3^- contidos no CEP em NO em quantidades equimolares. O NO é sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador e reage com o ozônio (O_3), formando dióxido de nitrogênio (NO_2^-). O NO_2^- apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície foto-sensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de NO na amostra. A concentração de NO é calculada por comparação com uma curva padrão usando concentrações conhecidas (5 µM, 10 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM) de nitrato de sódio. Os valores de NO são expressos em micromolar (µM).

Figura 12- Analisador de nitrito/nitritato Sievers 280i NOA (Sievers, Boulder, CO, EUA) adquirido com verba do projeto 00/08537- 3 – FAPESP.

Todo material a ser utilizado nesta técnica são enxaguados com água MilliQ, livre de contaminantes. As análises são realizadas por pessoal especializado e capacitado, que compõem o quadro de funcionários do Laboratório de Função Endotelial da FMRP-USP, do Departamento de Cirurgia e Anatomia.

3.7. Análise estatística

Os dados foram apresentados como médias ± desvio padrão. O teste de Shapiro-Wilk e gráficos “Normal Q-Q” foram utilizados para avaliar a distribuição dos valores obtidos com as amostras. Foi realizada estatística descritiva, verificando a existência ou não de correlação. Utilizou-se a correlação de Spearman, entre a concentração de NO no condensado do exalado pulmonar, com a idade; “volumes

expirados” e volume de condensado do exalado pulmonar. As comparações entre gêneros foram feitas utilizando o teste de Mann-Whitney e as comparações entre grupos etários foram feitas empregando-se o teste de Kruskal-Wallis. O software SPSS 15.0 foi utilizado para execução das análises estatísticas.

4. RESULTADOS

Os valores obtidos para idade, concentração de NO no CEP, volume exalado total, e volume do condensado do exalado não apresentaram distribuição normal, segundo o teste de Shapiro-Wilk e ao gráficos Normal Q-Q (figura 13).

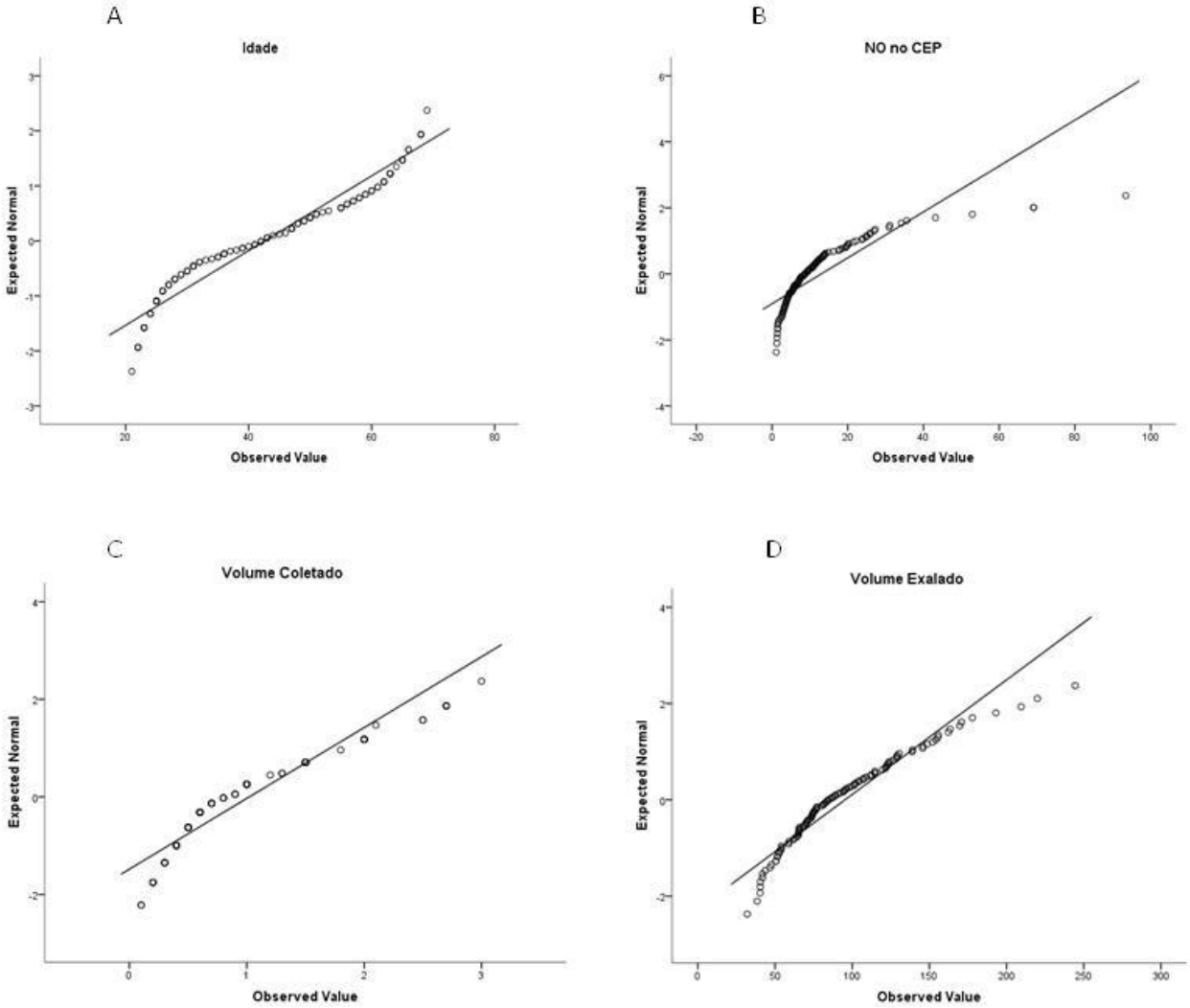


Figura 13. Gráficos Q-Q para a distribuição de valores de idade (A), concentração de NO no CEP (B), volume de condensado coletado (C) e volume exalado total (D).

4.1 Dados demográficos de medidas ventilatórias

Os dados demográficos de todos os voluntários estão descritos na tabela 2. Para o estudo concordaram em participar 116 (cento e dezesseis) indivíduos, sendo 74 (setenta e quatro) do gênero feminino e 42(quarenta e dois) do gênero masculino. Destes, 4 (quatro) foram excluídos por apresentarem valores de concentração de NO no CEP superiores a três vezes o intervalo interquartil, tendo sido considerado como erro metodológico ou processo inflamatório respiratório não identificado durante a seleção.

Tabela 2- Características da População Estudada

	Idade, anos					
Variáveis	**Todos**	**20-30**	**31-40**	**41-50**	**51-60**	**61-70**
Fem/Masc	116	21/ 14	7/ 11	18/ 6	14/6	14/ 5
Idade (anos)	42,85±14,66	26,7± 1,45	33,8 ± 3,0	45,35 ± 2,5	54,7±3,0	63,81±2,74
Peso (kg)	71,50±15,88	69,84 ± 18	83,55 ± 15,3	68,47 ± 13,28	68,12 ± 15,33	68,35 ±11,53
Altura (cm)	160,61±29,12	163,70 ± 29	171,88 ± 8,83	164,45 ± 9,02	147,61 ± 50,69	160,85 ± 7,1
VC (ml)	541,91±272,76	554(456-652)	594,01 (455-732)	552 (428-675)	465 (315-615)	528 (396-659)
VM (L)	9,03±4,38	8,67 (7,18-10,16)	8,82 (7,03-10-62)	8,41 (6,93-9,88)	9,90 (6,81-12,99)	9,45 (7,43-11,47)
FR (ipm)	13,37±4,32	12,4 (11,20-13,61)	12,70 (11,05-14,50)	12,95 (11,32-14,57)	13,55 (11,56-15,53)	15,05 (11,97-18,14)

*Intervalo de confiança 95%; DP- Desvio Padrão. Fem- feminino;Masc- masculino;VC- volume corrente em mililitros;VM- volume minuto em litros;FR-frequência respiratória em incursões por minuto.

4.2 Óxido Nítrico no Condensado do Exalado Pulmonar

O NO foi detectável no CEP de todos os indivíduos. A média encontrada na amostra estudada (n=112) foi de 13±14,4μM (IC 95%:10,3-15,7μM), o erro-padrão foi 1,35 μM e a mediana de 8,7 μM (Q_1-Q_3: 1,1-93,4). A tabela 3 e a figura 14 mostram a concentração de NO no CEP por faixa etária.

Tabela 3- Valores de média, erro-padrão, desvio padrão, mediana, intervalo de confiança 95% e Q_1-Q_3 da concentração de NO (µM)

Óxido Nítrico no CEP	Faixa Etária (anos)						
	Todos	G1	G2	G3	G4	G5	
	20-70	20-30	31-40	41-50	51-60	61-70	P
N	112	34	18	24	17	19	
Média	12,99	12,54	10,47	16,99	9,71	14,09	
Erro-padrão	1,35	3,02	2,25	3,96	1,32	1,92	
Desvio Padrão	14,38	17,64	9,58	19,42	5,47	8,40	
Mediana	8,72	6,90	6,49	9,14	9,40	12,45	0,301*
IC 95%	10,30-15,69	6,38-18,70	5,70-15,23	8,79-25,19	6,89-12,52	10,04-18,14	
Q_1-Q_3	1,11-93,45	4,03-13,51	3,10-17,50	3,72-20,18	6,58-11,25	9,65-19,62	

*Teste Kruskal-Wallis.

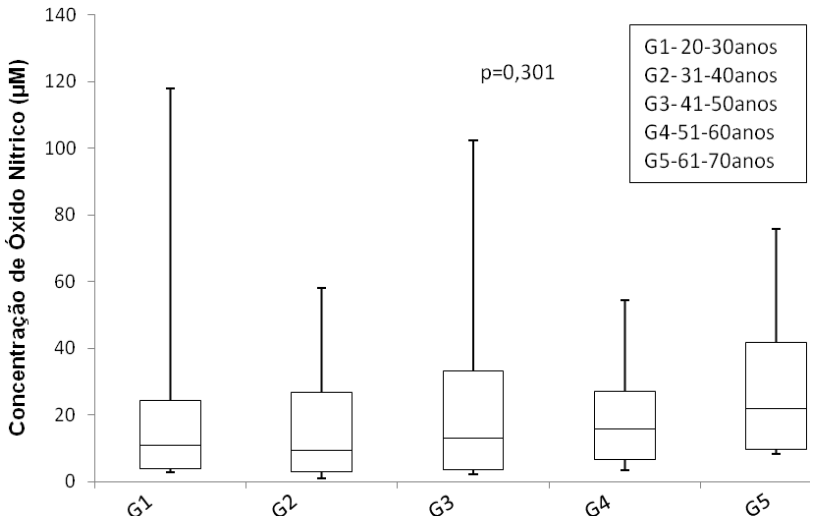


Figura 14. Valores da concentração de NO (µM) no CEP por faixa etária.

Não se observou diferença significativa na concentração de NO no CEP entre voluntários do gênero masculino e feminino (figura 15). Também não se observa diferenças significativas entre voluntários masculinos e femininos, dentro das faixas etárias (tabela 4).

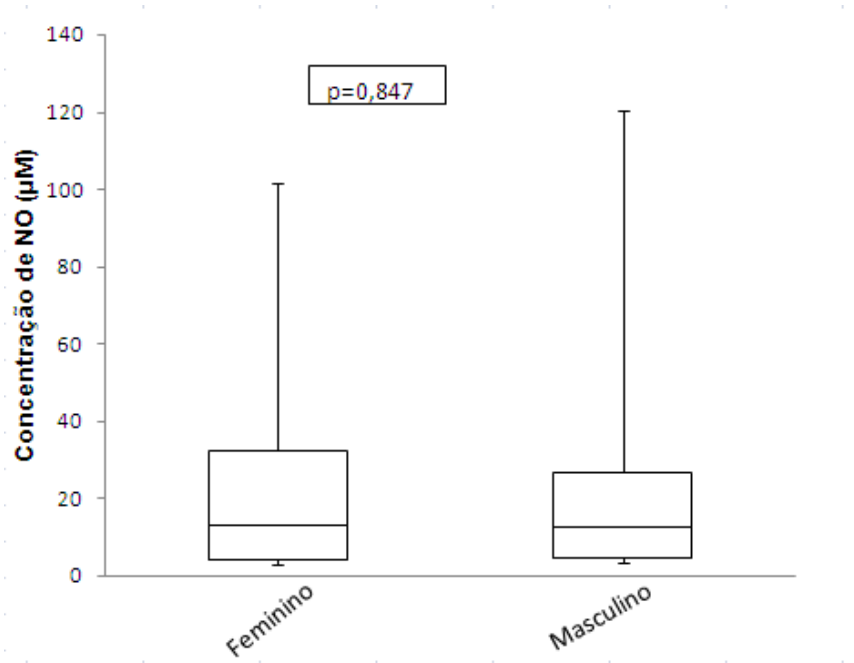


Figura 15. Concentração de NO nos voluntários do gênero masculino e feminino.

Tabela 4. Comparação entre os valores de NO no CEP para os voluntários femininos e masculinos dentro de cada faixa etária.

	Grupos estratificados por Faixa Etária e gênero														
	G1			G2			G3			G4			G5		
	20-30 anos			31-40 anos			41-50 anos			51-60 anos			61-70 anos		
	Fem	Masc	p	Fem	Masc	p	Fem	Masc	p	Fem	Masc	p	Fem	Masc	p
Média	10,77	15,41		13,82	8,34		17,64	15,03		10,31	7,76		12,28	19,16	
DP	12,22	24,35		10,98	8,41		20,98	15,23		5,02	3,62		7,70	9,03	
Mediana	6,71	8,30	0,436	8,88	5,79	0,258	8,41	11,67	0,947	9,58	7,98	0,365	11,70	17,62	0,165

*Teste Mann-Whitney; DP- Desvio Padrão, Fem- feminino; Masc-masculino

Não se observou correlação entre a concentração de NO no CEP e a idade, conforme demonstra a figura 16.

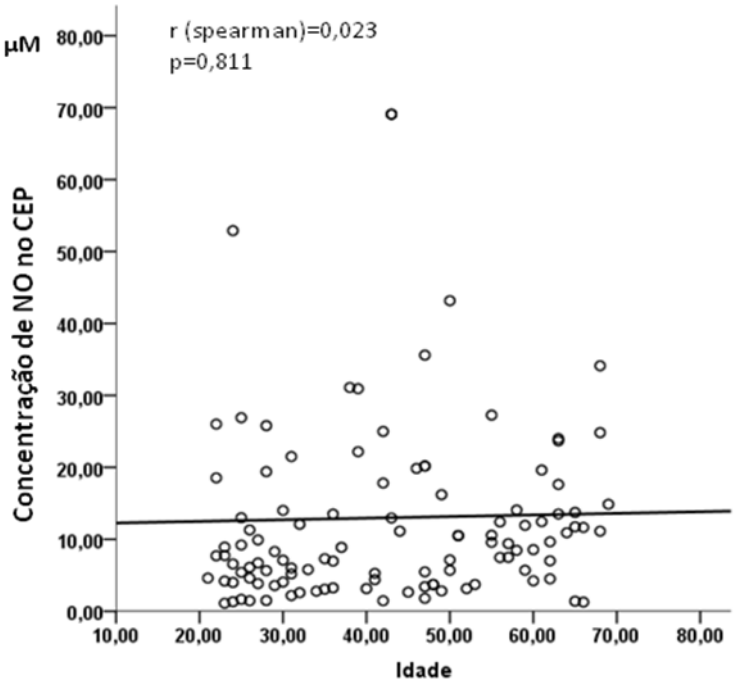


Figura 16. Correlação entre concentração de NO no CEP e idade, independentemente do gênero.

4.3 Volumes Exalado Total e do Condensado do Exalado Pulmonar coletado

A tabela 5 mostra os valores para os volumes exalado total e CEP, coletado independentemente do gênero e faixa etária. A figura 17 mostra os volumes exalados total e do condensado do exalado pulmonar, coletado dos voluntários por gênero. Não se observou diferenças significativas entre os gêneros.

Tabela 5- Valores de volume exalado total (L) e volume de CEP coletado (ml).

	Volume exalado total(l)	Volume coletado (ml)
Média (IC95%)	95,3(87,4-103,1)	1 (0,9-1,1)
Mediana (Q_1-Q_3)	84,6 (65,3-84,6)	0,8 (0,5-0,8)
erro-padrão	3,9	0,06

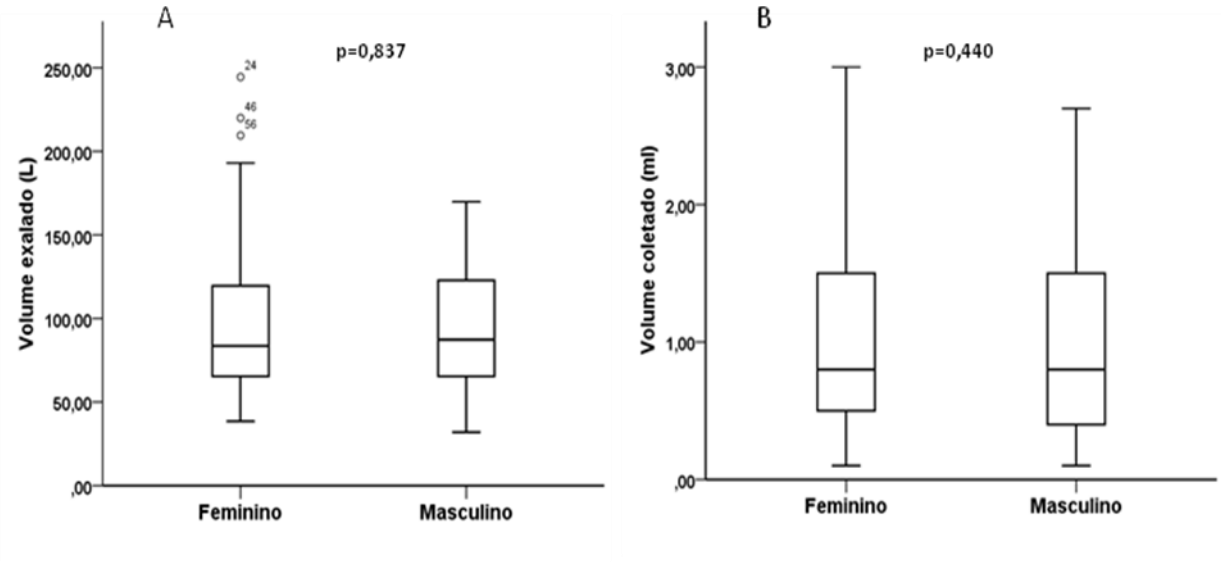


Figura 17. Volumes exalado total e de CEP coletado por gênero

Quando se compara as faixas etárias, sem distinção de gênero, as diferenças observadas não são significativas (tabela 6). Não houve correlação entre a concentração de NO no CEP e o volume de CEP coletado (figura 18).

Tabela 6- Comparação entre os valores de Volume Exalado Total e Volume de CEP coletado dentro de cada faixa etária.

		G1 20-30 anos	G2 31-40 anos	G3 41-50 anos	G4 51-60 anos	G5 61-70 anos	p
Volume Exalado Total (l)	N	34	18	24	17	19	
	Média	97,27	87,94	96,73	96,51	95,95	
	DP	41,61	29,97	41,89	51,38	46,96	
	EP	7,136	7,064	8,552	12,46	10,77	
	Mediana	88	85,52	93,27	75	80,24	0,997
Volume Coletado (ml)		34	18	24	17	19	
	Média	0,8912	0,9722	1,017	1,171	1,168	
	DP	0,567	0,6918	0,6716	0,7744	0,838	
	EP	0,09723	0,1631	0,1371	0,1878	0,1923	
	Mediana	0,7	0,75	1	1	0,9	0,749

*Teste Kruskal-Wallis.

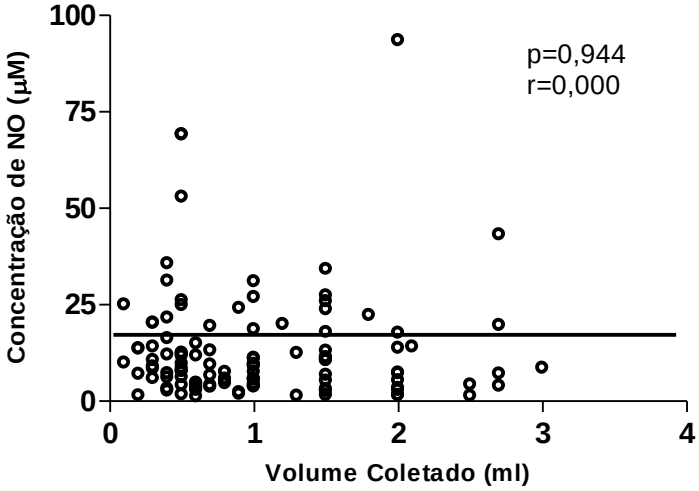


Figura 18- Correlação entre o NO e o Volume do CEP Coletado

Todavia, na comparação entre voluntários masculinos e femininos observou-se diferenças significativas no volume exalado total apenas para o grupos G4 e no volume de CEP coletado nos grupos G3 e G4 (tabela 7).

Tabela 7- Comparação do volume exalado total e volume de CEP coletado entre os gêneros para cada faixa etária.

		Grupos estratificados por Faixa Etária														
		G1 20-30 anos			G2 31-40 anos			G3 41-50 anos			G4 51-60 anos			G5 61-70 anos		
		Fem	Masc	p	Fem	Masc	p	Fem	Masc	p	Fem	Masc	p	Fem	Masc	p
Volume	N	21	13		7	11		18	6		13	4		14	5	
Exalado	Média	99,98	92,89		91,54	85,66		90,38	115,76		106,81	63,04		96,06	95,67	
Total	EP	9,89	9,99		12,30	8,92		9,65	17,26		15,24	3,08		13,53	17,80	
	DP	45,35	36,04		32,57	29,59		40,96	42,29		54,97	6,17		50,65	39,81	
	Mediana	96,40	87,40	0,818	94,64	76,40	0,751	87,94	120,66	0,205	77,22	64,97	**0,031**	75,67	89,38	0,781
Volume	n	21	13		7	11		18	6		14	6		14	5	
Coletado	Média	,96	,77		1,16	,85		,82	1,60		1,37	,53		1,06	1,48	
	EP	,13	,13		,28	,19		,11	,33		,21	,09		,21	,42	
	DP	,60	,50		,76	,65		,50	,82		,78	,19		,80	,95	
	Mediana	,70	,70	0,381	1,00	,50	0,274	,75	1,75	**0,037**	1,30	,45	**0,027**	,70	1,50	0,328

EP- erro padrão; DP- desvio padrão.

Verificamos que não existe correlação entre o volume exalado total e a idade (p=0,719, r=-0,034), tampouco entre volume de CEP coletado e idade (p=0,234, r=-0,113), mas há forte correlação positiva entre o volume exalado total e o CEP coletado (p<0,001, r=0,781), como demonstrado na figura 19.

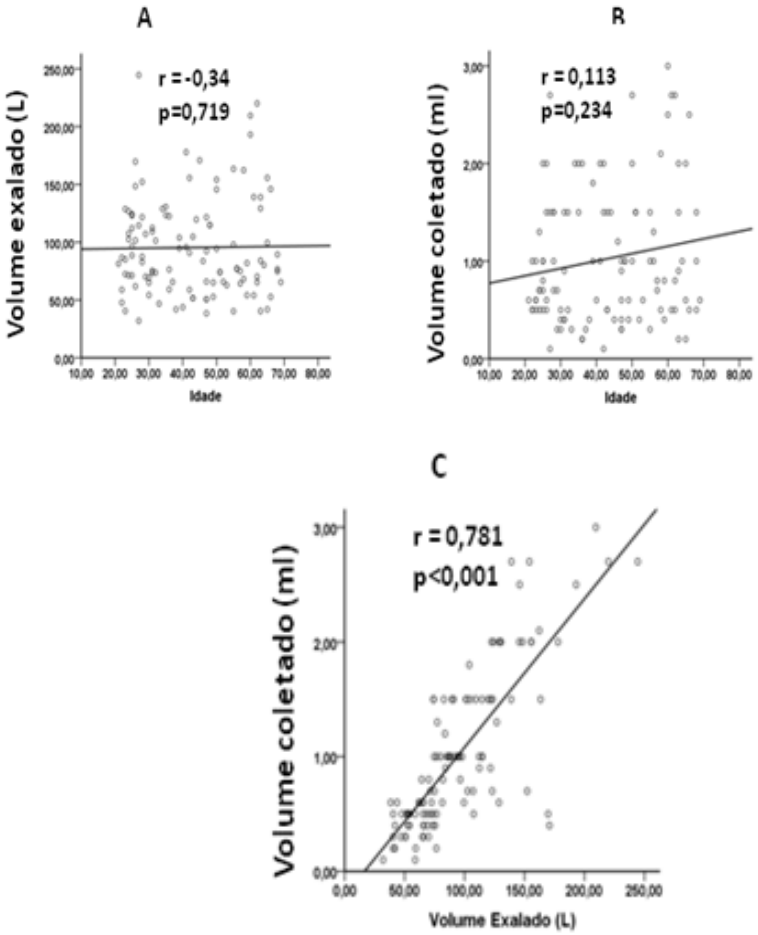


Figura 19. Correlação entre volume exalado total e idade (A); volume de CEP coletado e idade (B); volume exalado total e volume de CEP (C).

4.4 Efeitos adversos

Nenhum voluntário desistiu durante a coleta, bem como nenhum voluntário apresentou sinais ou sintomas de desconforto que exigissem a interrupção da coleta do CEP.

5. DISCUSSÃO

6.

O presente estudo demonstrou que o aparato idealizado e desenvolvido é viável e eficaz para coletar o CEP e, ainda permite a execução da dosagem, pelos métodos usuais disponíveis, de NO no condensado coletado da maneira proposta, um marcador de interesse em diversas situações clínicas [32, 36, 40] .

O protótipo é de confecção simples e reprodutível, reutilizável, de descontaminação factível por meios usualmente empregados no ambiente hospitalar. É de baixo custo, uma vez que não existem aparatos nacionais disponíveis, sendo a importação a única maneira de obtenção dos comercialmente disponíveis. Nossos resultados também demonstram que o método é seguro e confortável.

Todavia, alguns aspectos inerentes ao aparato, como o tipo de material de fabricação, são de grande importância e devem ser considerados, uma vez que podem influenciar os níveis dos biomarcadores. Os aparatos comerciais EcoScreen e Rtube são produzidos respectivamente com teflon e alumínio[59]. Alguns aparatos artesanais descritos na literatura são produzidos com vidro e, podem ou não ser revestidos com silicone[48]. Para a construção do aparato em estudo, o vidro do tipo bososilicato foi eleito por se tratar de um material inerte com menor probabilidade de influenciar o marcador analisado.

Liu *et al*[59] realizaram um estudo comparativo para verificar a influência do material, do qual eram feitos quatro aparatos diferentes: dois comercias, o EcoScreen e o Rtube, construídos respectivamente de teflon e alumínio, e dois artesanais, ambos de vidro, porém um deles revestido com silicone. Em relação aos metabólitos do NO, foram observadas concentrações e volume coletado maiores

com o uso do EcoScreen, comparado ao Rtube e ao vidro revestido com silicone, o que talvez se deva à temperatura de coleta, pois a estabilidade do NOx pode estar relacionada com a temperatura. Porém, em relação ao de vidro não houve diferença significativa. Soyer et al [49] também conseguiram maiores volumes utilizando o EcoScreen comparado ao Rtube. Ademais, Rosias *et al*[48] observaram maior eficiência para mensuração de 8-isoprostano e albumina nos condensadores confeccionados com vidro borosilicato e vidro revestido com silicone, comparado ao de alumínio e ao de telfon. Eles atribuíram este achado ao fato de que a capacidade adesiva seja menor nas paredes, com as quais o exalado tem contato nos aparatos de vidro, resultando na maior captação dos biomarcadores no condensado resultante. Portanto, tanto o material do aparato quanto a temperatura podem exercer influência sobre mediadores, não permitindo a comparação direta entre eles.

Assim, uma vez que cada aparato pode fornecer resultados diferentes para o mesmo marcador, são necessários mais estudos a fim de padronizar o aparato ideal para determinado marcador passível de dosagem no CEP. Todavia, há de se considerar que ainda não se chegou a uma conclusão sobre qual material seria mais apropriado para cada marcador.

A estabilidade do NO está associada com a temperatura, o que torna de total relevância considerá-la durante a coleta do CEP. Apesar disso permanece desconhecido a temperatura ideal de coleta para muitos biomarcadores[59]. Segundo a ATS/ERS, há expectativas de que temperaturas baixas sejam melhores para os mediadores instáveis, mas este fato ainda não foi comprovado e não é necessariamente ideal[31]. Apesar disso, a própria ATS/ERS recomenda realizar as coletas sob baixas temperaturas e sugere que mais estudos sejam realizados para definir a temperatura ideal para diferentes marcadores[31].

Por se tratar de um método que condensa o ar exalado, todos os aparatos para este fim contam com um sistema de refrigeração, seja ele por meio de líquido gelado, gelo ou gelo seco ou ainda, por sistema de refrigeração elétrica. O que motivou a escolha da forma de resfriamento do aparato utilizado neste estudo, foram os resultados positivos em relação ao estabelecimento de temperaturas negativas, alcançadas por Reis *et al*[60] e Hunt[41].

O resfriamento do EcoScreen se dá através da refrigeração elétrica da câmara do aparato, atinge em média -15ºC[49], já o resfriamento do Rtube é conseguido através da colocação do aparato em freezer convencional e atinge temperatura de -20ºC, porém é variável e tende a aumentar dependendo do tempo de execução da coleta[49]. O TURBO-DECCS, é resfriado através de um sistema termoelétrico ativado por um circuito eletrônico, o seu termostato permite ajustar a temperatura em até -10ºC[46]. Portanto, a forma de resfriamento do aparato proposto por este estudo é viável para realização de coletas, pois garante temperatura negativa como é recomendado pela ATS/ERS[31].

Há uma escassez de estudos acerca de valores de concentração de NO no CEP de indivíduos hígidos, em especial na população brasileira. A proposta deste estudo não era a de comparar o protótipo idealizado com os já disponíveis no mercado internacional, mas sim de desenvolver uma alternativa nacional de baixo custo, reprodutível e reutilizável e utilizar os resultados obtidos como ponto de partida para futuras pesquisas visando aperfeiçoamento e aplicação clínica.

Alguns fatores podem influenciar os valores obtidos de NO. Os estudos a respeito dos efeitos da idade sobre os níveis de marcadores inflamatórios são escassos. Os resultados obtidos não revelaram correlação entre a concentração de NO e a idade ou gênero dos voluntários, não se encontrou na literatura investigações que abordassem a correlação entre a concentração de NO no CEP de

voluntários saudáveis com idade e gênero. O estudo realizado por Gordon[61] correlacionando NO exalado, não o CEP, com a idade, verificou-se maiores concentrações em indivíduos com idade superior a 60 anos. Porém o estudo realizado por Cruz et al[35] em 75 indivíduos saudáveis não observou nenhuma relação entre a idade e NO no CEP. Entretanto, são necessárias mais investigações a fim de evidenciar melhor a possível relação da idade com estes e com outros marcadores inflamatórios. Apesar da carência desse tipo de investigação, a ATS/ERS[50] recomenda que seja considerado um potencial efeito do gênero, da idade e da raça sobre a concentração dos biomarcadores e que mais estudos são necessários para estabelecer dados de referência para diferentes mediadores no CEP.

Os valores de NO no CEP encontrados são semelhantes aos observados por outros investigadores como Ojoo *et al*[62], Liu *et al*[56], os quais utilizaram aparatos de vidro e Hoffmeyer *et al*[63] que utilizou o aparato comercial EcoScreen, apesar da proximidade de concentração encontrada entre os achados, o método de análise foi diferente da utilizada no presente estudo e os tamanhos amostrais descritos são muito menores que o estudado[56, 62-63]. Já os resultados apresentados por Franklin *et al*[64] e Dressel *et al*[65] , demonstraram concentrações inferiores o que talvez possa ser explicado pelo tipo de aparato utilizado, tubo de cloreto de polivinila e EcoScreen respectivamente. Ganas et al[66] apesar de utilizarem um de vidro obtiveram concentrações menores que as encontradas neste estudo, porém utilizou-se outra forma de análise de concentração, o que talvez explique a diferença encontrada. Pois como demonstrado por Reis[60], há diferenças quando se compara a forma de análise por Griess e Quimioluminescência.

O cigarro está associado com o aumento do estresse oxidativo nos pulmões, contribuindo com danos ao epitélio das vias aéreas tornando-o um fator que afeta

diretamente os níveis de NO, que em indivíduos tabagistas, é cronicamente reduzido, possivelmente por desregulação da cNOS. Porém, esses níveis são reversíveis e podem aumentar após a cessação do ato tabágico [67]. Horváth, Hunt e Barnes [31] confirmaram que a exposição, aguda ou crônica, ao cigarro altera os níveis de NO_2- no CEP, bem como de outros compostos. No estudo desenvolvido foram tomados os devidos cuidados e excluídos os voluntários tabagistas.

Outro fator que contribui potencialmente para alteração da expressão de NO é a dieta alimentar. Os vegetais e frutas são ricos em NO_3^- e outros gêneros alimentícios como as carnes enlatadas em NO_2^-. A ATS/ERS recomenda evitar comida e bebida antes da coleta do CEP, abstendo-se de tais atos horas antes do procedimento[31]. Kharitonov e Barnes[38] revelam que a presença de altas concentrações de NO_2^- e NO_3^-, provenientes da dieta, podem afetar os marcadores derivados do NO no CEP, pois várias fontes alimentares podem servir de substrato para a formação de NO através da via independente de enzimas NOS. No presente estudo, os voluntários não ingeriram comida ou bebida 3 horas antes do procedimento.

Em relação às medidas ventilatórias durante a coleta, houve semelhança entre os achados com o estudo realizado por Lema et al[36] e Liu[68] e que sugerem que, o volume minuto e corrente podem predizer a quantidade de CEP que pode ser esperado na coleta, e ainda, de acordo com Montuschi[39], o volume de CEP coletado é dependente da duração da coleta, do volume expiratório total e da frequência respiratória. Não se encontrou correlação entre a concentração de NO e o volume exalado o que corrobora os resultados do estudo realizado por Franklin *et al*[64]. Esta é uma questão pouco esclarecida, pois, há carência de estudos que evidenciam a real influência do fluxo sob diversos mediadores, entre eles o NO[50].

Sabe-se, portanto, que o fluxo é diretamente proporcional à turbulência gerada nas vias aéreas inferiores. O que pode resultar na geração de quantidade maior de partículas de vapor de água e moléculas de gases, possibilitando a obtenção de amostras de regiões mais distais do pulmão. Por outro lado, com o aumento do vapor de água, poderá haver a diluição das partículas gasosas refletindo na concentração de NO. É recomendado que a exalação seja lenta, a partir da capacidade pulmonar total[21, 41].

Para muitos marcadores não há informações sobre a influência do fluxo aéreo e/ou do padrão ventilatório em suas concentrações no CEP, e os dados encontrados na literatura são controversos, tornando-se necessária a realização de mais estudos. A avaliação da dependência do fluxo de diferentes marcadores é importante para a padronização da técnica, de maneira que a coleta do CEP possa ser executada com uma taxa de fluxo constante por um período de tempo fixo [39].

O volume da amostra conseguido em geral, está em torno de 1 a 3 ml em coletas que variam de 10 a 15 minutos de respiração. O tempo de coleta descritos em alguns estudos varia entre 10-30 minutos, porém evitam-se coletas com tempos demasiadamente curtos ou prolongados [31, 36, 69-70]. A duração de coleta realizada neste estudo permitiu coletar uma quantidade satisfatória de condensado e que foi passível de dosagem, o tempo foi similar a vários estudos[66-65]. Vaughan, et al[71] observaram que quanto maior o tempo de coleta maior a quantidade de líquido obtido, o que foi verificado também neste estudo. Apesar das variações do tempo de coleta, é recomendado o tempo de 10 minutos por duas razões práticas: primeiro porque este tempo de coleta resulta em média em 1-2ml, quantidade suficiente para análises e, segundo, porque este período de tempo é bem tolerado pelos indivíduos submetidos à coleta e não causa fadiga[50].

É pouco provável que uma única técnica de coleta seja ótima para todos os componentes analisados no CEP. Os achados evidenciam e reforçam a necessidade de padronização e eleição de determinado tipo de aparato, bem como a forma de análise para cada biomarcador, a fim de permitir a comparação entre estudos. E ainda, alguns pesquisadores apontam para a necessidade de determinar valores de referência de diferentes biomarcadores em indivíduos saudáveis, assim como uma definição mais precisa de suas concentrações nos pacientes com doenças pulmonares [39, 42, 50, 55].

O aparato desenvolvido é eficaz, todavia, reconhecemos alguns pontos desfavoráveis, em relação aos comerciais, como o não congelamento imediato da amostra e as dimensões do aparato, questões que são relativamente simples e que com o reajuste de alguns detalhes podem contribuir para o melhoramento do dispositivo, mas apesar disto, foi possível obter amostras do fluido de revestimento das vias aéreas com sucesso.

Segundo Montuschi[72], o futuro do CEP ainda é obscuro e o seu impacto, tanto na pesquisa quanto na prática médica, é igualmente vago, embora seja um método promissor. Revela ainda que a força tarefa internacional, composta por investigadores de todo o mundo, foi organizada justamente para promover e ampliar os conhecimentos a cerca do CEP, com o intuito de estimular novas investigações, encontrar novos horizontes para o método e solidificar o seu futuro. Pois o CEP ainda está na sua infância e tem grande potencial para ser utilizado em pesquisas e ser, posteriormente, inserido na comunidade clínica, iniciando-se assim uma nova era na medicina respiratória.

7. CONCLUSÃO

O nosso aparato e o procedimento de coleta utilizado foram eficazes para obter as concentrações de NO no CEP. O volume de CEP coletado é dependente do volume de ar exalado no procedimento. Não foram encontradas correlações entre as concentrações de NO no CEP comparando a idade e o gênero.

.

REFERÊNCIAS

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980 Nov;288(5789):373-6.

2. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.

3. Marletta M, Yoon P, Iyengar R, Lead C, J W. Macrophage Oxidation of L-Arginine to Nitrite and Nitrate: Nitric Oxide Is an Intermediate. Biochemistry. 1988;27 (24):8706-11.

4. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(24):9265-9.

5. Centelles JJ, Esteban C, Imperial S. Óxido nítrico. Offarm. 2004;23(11):96-102.

6. Vanni DS, Horstmann B, Benjo AM, Daher JPL, Kanaan S, Sleiman M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. J Bras Patol Med Lab. 2007;43(3):181-9.

7. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. Sci Am. 1992 May;266(5):68-71, 4-7.

8. Viant DF, Fonseca CJ, Rodríguez REG, Anglada. PFM. Óxido Nitrico: Importância Biológica y participaión en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. MEDISAN 1998;2(3):45-53.

9. Acher S. Measurement of nitric oxide in biological models. The FASEB Journal. 1993;7:349-60.

10. Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil. 2000;46(3):265-71.

11. Hataishi R, Rodrigues A, Neilan T, Morgan J, Buys E, Shiva S, et al. Inhaled nitric oxide decreases infarction size and improves left ventricular function in a murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291:H379–H84.

12. Hataishi R, Rodrigues A, Neilan T, Morgan J, Buys E, Shiva S, et al. Inhaled nitric oxide decreases infarction size and improves left ventricular function in a murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;291:H379–H84.

13. Barry A. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. Nutrition. 1998;14:376-90.

14. Queiroz S, Batista A. Funções biológicas do óxido nítrico. Quimica Nova. 1999.

15. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. Molecular Aspects of Medicine. 2005;26:3-31.

16. Viaro F, Evora PRB. Expressão das óxido nítrico sintetases na vasculopatia coronariana do transplante cardíaco. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2000;15(1):55-65.

17. Barreto RLC, C.R.D; Muscará, N.M. Óxido Nítrico: Propriedades e Potenciais usos terapêuticos. Quim Nova. 2005;28(6):1046-54.

18. Benjamin N. Stomach NO synthesis. Nature. 1994;368:502.

19. Cosby K. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. Nature Med. 2003;1:804-9.

20. Kavya R, Saluja B, Singh S, Dikshi M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implications in Parkinson's disease. Nitric Oxide 15 (2006) 280–294. 2006;15:280–94.

21. Vogelberg C, Kahlert A, Würfel C, Marx K, Böhm A, Range U, et al. Exhaled breath condensate nitrite – methodological problems of sample collection. Med Sci Monit. 2008;14(8):416-22.

22. Karpuzoglu E, Fenaux J, Phillips R, Lengi A, Elvinger F, Ahme S. Estrogen Up-Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase, Nitric Oxide, and Cyclooxygenase-2 in Splenocytes Activated with T Cell Stimulants: Role of Interferon-Y. Endocrinology. 2005;147(2): 662-71.

23. Chatkin JM, Djupesland P, Q W, Haight J, N Z. Óxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias. J Pneumologia 2000;26(1):1-20.

24. Djupesland PG, Qian W, Haight JSJ. A New Method for the Remote Collection of Nasal and Exhaled Nitric Oxide. Chest 2001. 2001;120:1645-50.

25. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System. Physiol Rev. 2004;84:731–65.

26. Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). FASEB journal. 1998;12(10):773-90.

27. Andrew PJ MB. Enzymatic function of nitric oxide synthases. . Cardiovasc Res 1999;43(3):521-31.

28. Barnes JP, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. Thorax. 1993;48:1034-43.

29. Hart MC. Nitric Oxide in Adult Lung Disease. Chest. 1999;115:1407-17.

30. Effros RM, Biller J, Foss B, al e. A Simple Method for Estimating Respiratory Solute Dilution in Exhaled Breath Condensates. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:1500–5.

31. Horvath I, Hunt J, Barnes P. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. European Respiratory Journal. 2005;26(3):523-48.

32. Liu J, Thomas PS. Exhaled breath condensate as a method of sampling airway nitric oxide and other markers of inflammation. Medical Science Monitor. 2005;11(8):MT53-MT62.

33. Cepelak I, Dodig S. Exhaled breath condensate: a new method for lung disease diagnosis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2007;45(8):945-52.

34. Kovesi T, Marczin N, Royston D. Exhaled nitric oxide as a marker of lung injury in coronary artery bypass surgery. Br J Anaesth 2003;90:101-5.

35. Cruz MJ, Sanchez-Vidaurre S, Romero PV, Morell F, Munoz X. Impact Of Age on pH, 8-Isoprostane, and Nitrogen Oxides in Exhaled Breath Condensate. CHEST 2009;135:462–7.

36. Lema JB, González M, Vigil L, Casan P. Exhaled Breath Condensate: Standardized Collection of Samples From Healthy Volunteers. Arch Bronconeumol. 2005;41(10):584-6

37. González-Mangado N. Analysis of Exhaled Breath Condensate: a Technique With a Future? Arch Bronconeumol. 2005;41(10):540-1.

38. Kharitonov SA. Exhaled markers of inflammatory lung diseases: ready for routine monitoring? Swiss Medical Weekly. 2004;134(13-14):175-92.

39. Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications. Therapeutic Advances in Respiratory Disease. 2007;1(1):5-23.

40. Gokhan MM, Garey KW, R.A R, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and Analysis of Exhaled Breath Condensate in Humans. Am J Respir Crit Care Med 2001;164:731–7.

41. Hunt J. Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002;110(1):28-34.

42. Montuschi P, Barnes PJ. Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. Trends in Pharmacological Sciences. 2002;23(5):232-7.

43. Marteus H, Tornberg DC, Weitzberg E, Schedin U, Alving K. Origin of nitrite and nitrate in nasal and exhaled breath condensate and relation to nitric oxide formation. Thorax. 2005;60(3):219-25.

44. Jackson A, Sandrini A, Campbell C, Chow S, Thomas P, Yates D. Comparison of Biomarkers in Exhaled Breath Condensate and Bronchoalveolar Lavage. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:222–7.

45. Chladkova J, Krcmova I, Chladek J, Cap P, Micuda S, Hanzalkova Y. Validation of nitrite and nitrate measurements in exhaled breath condensate. Respiration. 2006;73(2):173-9.

46. Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, et al. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. BMC Pulmonary Medicine 2005:5-10.

47. Cao W, Duan Y. Breath analysis: Potential for clinical diagnosis and exposure assessment Clin Chem. 2006;52:800-11.

48. Rosias P, Robreoks C, Niemarkt H, Kester A, Vernooy J, Suykerbuyk J, et al. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. European Respir J. 2006;28(5):1036-41.

49. Soyer O, Dizdar E, Keskin O, Lilly C, Kalayci O. Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. Allergy 2006;61:1016–8.

50. ATS workshop proceedings: Exhaled nitric oxide and nitric oxide oxidative metabolism in exhaled breath condensate - Executive summary. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2006;173(7):811-3.

51. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2001;164(5):731-7.

52. Reis GS, Augusto VD, de Souza MEJ, Evora PRB. Exhaled breath condensate for nitric oxide dosage. A safe and low cost adaptation. Nitric Oxide-Biology and Chemistry. 2008;19:S62-S.

53. Vass G, Huszár É, Barát E, Molnár-Világos G, Valyon M, Horváth I, et al. The effect of the use of nose clip on exhaled breath condensate Am J Respir Crit Care Med 2002;165:15

54. Carraro S, Baraldi E. Exhaled NO and breath condensate. Paediatric Respiratory Reviews. 2006;7:20-2.

55. Hunt J. Exhaled Breath Condensate—an overview. Immunol Allergy Clin North Am 2007 November ; 27(4): 587. 2007;27(4):587-96.

56. Liu J, Sandrini A, Thurston MC, Yates DH, Thomas PS. Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. Respiration. 2007;74:617-23.

57. Romero PV, Rodríguez B, Martínez A, Cañizares R, Sepúlved D, Manres F. Estrés oxidativo en el condensado exhalado de pacientes con infección pulmonar grave. Arch Bronconeumol 2006;42(3):113-9.

58. Rosias P, C.M. Robroeks C, Kesterm A, Hartog A, Wodzig K, Rijkerse G, et al. Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers. Eur Respir J 2008;31:934–42.

59. Liu J, Conrad D, Chow S, Tran V, Yates D, Thomas P. Collection devices influence te constituens of exhaled breath condensate. European Respir J. 2007;30(4):807-8.

60. Reis G. Estudo do nitrito do condensado do exalado pulmonar. Padronização de método. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP); 2008.

61. Gordon R. A Comparison of Exhaled Breath Nitric Oxide Between Old and Young Individuals. Flórida, EUA: College of Public Health University of South Florida; 2004.

62. Ojoo J, Mulrennan S, Kastelik J, al. e. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis. Thorax. 2005;60:22-6.

63. Hoffmeyer F, Harth V, Merget R, Goldscheid N, Heinze E, Degens P, et al. Exhaled breath condensate analysis: Evaluation of a methodological setting for epidemiological field studies. Journal of Physiology and Pharmacology. 2007;58:289-98.

64. Franklin P, Moeller A, Hall GL, Horak F, Patterson H, Stick SM. Variability of nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate. Respiratory Medicine. 2006;100(1):123-9.

65. Dressel H, Muller F, Fischer R, Rommelt H, Hohlfeld M, Behr B, et al. Independent Information of Nonspecific Biomarkers in Exhaled Breath Condensate. Respiration 2010;80:401-9.

66. Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P, Kalogeropoulos N. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. Respiratory Medicine. 2001;95(8):649-54.

67. Balint BD, L. E; Hanazawa, T. et al. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. Thorax. 2001;56(6):456-61.

68. Liu J, Thomas P. Relationship between Exhaled Breath Condensate Volume and Measurements of Lung Volumes. Respiration. 2005;74:142-5.

69. Vaughan J, Ngamtrakulpanit I, al e. Exhaled Breath Condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. Eur Respir J 2003;22(6):889-94.

70. Scheideler L, al e. Detection of nonvolatile macromolecules in breath: a possible diagnostic tool? Am Rev Respir. 1993;148:778–84.

71. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski T, Turner R, Nguyen T, Smith A, et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. Eur Respir J. 2003;23(6):889-94.

72. Montuschi P. New perspectives in monitoring lung inflammation: analysis of Exhaled Breath Condensate. Flórida, EUA: Boca Raton; 2005.

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética:

HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 10 de junho de 2009

Ofício nº 1856/2009
CEP/MGV

Depto. de Cirurgia e Anatomia
Recebi: Sandra
Data: 25.06.09
Hora: 10:20

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"ESTUDO DOS NÍVEIS DE NITRITO/NITRATO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE COLETA DO CONDENSADO DO EXALADO PULMONAR EM UMA AMOSTRA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS DA POPULAÇÃO BRASILEIRA"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 288ª Reunião Ordinária realizada em 08/06/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 4167/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

Marcia Villanova

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
DANIELLA ALVES VENTO
PROF. DR. ALFREDO JOSÉ RODRIGUES (Orientador)
Depto. de Cirurgia e Anatomia

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome:_____

Documento de Identidade:_____

Sexo:_____ **Data de Nascimento:**_____/_____/_____.

Endereço:_____

Bairro:_____**Cidade**:_____

CEP:_____**Telefone**:_____

DADOS SOBRE A PESQUISA

Titulo do Protocolo da Pesquisa: "Estudo dos níveis de nitrito/nitrato e validação de um método de coleta do condensado do exalado pulmonar em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira".

Pesquisador: Daniella Alves Vento **Cargo/função**: Fisioterapeuta

Inscrição do Conselho Regional: 104439-F -CREFITO-3

Unidade do HC-FMRP-USP: Campus

Avaliação do risco de pesquisa: Risco mínimo

Duração da Pesquisa: 36 meses

1- Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que tem como objetivo analisar o ar que sai dos seus pulmões.
2- Será utilizado um aparelho simples que não te causará nenhum dano, onde você irá respirar tranquilamente pela boca durante 10 minutos.
3- Você não corre nenhum risco, caso sinta algum desconforto, como tontura ou falta de ar o procedimento será interrompido. Nenhum dos procedimentos realizados oferecem riscos a sua saúde e dignidade.
4- Não há benefício direto para você, no entanto, no futuro, essas informações poderão ser usadas em beneficio de pessoas com algumas doenças pulmonares.
5- Em qualquer etapa do estudo, você poderá ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora Daniella Alves Vento encontra-se disponível através do telefone (16) 3421-5121 e o orientador responsável pela pesquisa é o Dr. Alfredo José Rodrigues que pode ser encontrado no endereço: Av.

Bandeirantes 3900, no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-SP, 9˚ andar, na Divisão de Cirurgia Torácica e Cardiovascular, no Campus da USP ou, através do telefone: (16) 3602-2497.

6- É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo. Não está previsto o pagamento de indenizações e você pode procurar seus direitos legais caso sinta-se lesado.

7- Todas as informações coletadas neste estudo serão mantidas em segredo. Os relatos na pesquisa serão identificados com um código, e não com o seu nome. Apenas os membros da pesquisa terão conhecimento dos dados.

8- Não haverá despesas para você em nenhum momento do estudo e também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa "**Estudo dos níveis de nitrito/nitrato e validação de um método de coleta do condensado do exalado pulmonar em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira".**

Eu discuti com a pesquisadora Daniella Alves Vento sobre a minha decisão em participar do estudo. Ficou claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas.

Eu_____

Portador do RG número _____ concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades e prejuízos.

_____ _____

Assinatura do Voluntário Assinatura da Testemunha

_____

Assinatura do Responsável pela Pesquisa

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20_____.

ANEXO III

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

Número da Amostra: _____
Nome:_____
Sexo: ( ) M ( ) F Idade: _____ Peso: _____kg Altura: _____cm
Possui doenças respiratórias?
( ) Asma ( ) Sinusite
( ) Bronquite ( ) Outras _____
( ) Rinite Alérgica
Possui doenças sistêmicas?
( ) Diabetes ( ) IAM ( ) Outras _____
( ) HAS ( ) AVC
Toma algum medicamento?
( ) Não ( )Sim
Qual (s)?
_____
É fumante?
( ) Não ( ) Sim
Quantos maços/dia? _____ Há quanto tempo? _____
Fumou nas há menos de 3 horas? ( ) Não ( ) Sim
Ingeriu algum alimento ou bebida há menos de 3 horas?
( ) Não ( ) Sim
Que tipo de alimento ou
bebida?_____

DADOS DA VENTILOMETRIA

VC: _____ ml VM: _____l FR: _____ipm

Ventilometria durante a coleta do CEP

Tempo	Freqüência Respiratória	Volume Minuto
1 minuto		
2 minutos		
3 minutos		
4 minutos		
5 minutos		
6 minutos		
7 minutos		
8 minutos		
9 minutos		
10 minutos		
TOTAL:	**ipm**	**L**

Volume coletado: _____ml

Ribeirão Preto, _____/_____/_____.