Daniela Mitiyo Odagiri Utiyama

Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo nos mecanismos de defesa de via aérea, propriedades do muco e inflamação nasal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação

Orientadora: Profa. Dra. Naomi Kondo Nakagawa

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Utiyama, Daniela Mitiyo Odagiri

Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo nos mecanismos de defesa de via aérea, propriedades do muco e inflamação nasal / Daniela Mitiyo Odagiri Utiyama. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências da Reabilitação.

Orientadora: Naomi Kondo Nakagawa.

Descritores: 1.Hábito de fumar 2.Abandono do hábito de fumar 3.Depuração mucociliar 4.Muco 5.Inflamação 6.Lavado nasal

USP/FM/DBD-051/17

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Edivaldo e
Cristina, ao meu marido, meus irmãos, minha tia
Lurdinha e aos meus queridos avós sempre me
apoiam e me incentivaram para conquistar meus
sonhos.*

Muito obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força e saúde para conseguir concluir mais uma etapa e superar as dificuldades.

À minha orientadora, Profa. Dra. Naomi Kondo Nakagawa, que sempre me ensinou muito nas relações pessoais e na área profissional, mostrando qual é o caminho e como devemos prosseguir, contribuiu tanto para a minha formação profissional como para pessoal e me inspirou nos momentos difíceis. Muito obrigada!

Aos amigos do laboratório que fiz durante esses anos, Tômas de Santana Carvalho, Tatiana Satie Kawauchi, Michelle Lisidati Franchini, Juliana Araújo Nascimento, Geisa Nascimento de Andrade, Carolina Tieko Yoshida, Camila Arcas, Marina Lazzari Nicola, Danielle Miyuki Goto. Obrigada pela convivência, pelos momentos delicados, pelas horas passadas no laboratório. Vocês são muito especiais.

Aos médicos Dr Ubiratan de Paula Santos e Dr Gustavo Faisbischew Prado pelos ensinamentos e colaboração com os voluntários do grupo da Cessação do Tabagismo. Ao ambulatório de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos colegas de sala e pesquisadores, Dra. Regiani Carvalho de Oliveira, Dra. Mariangela Macchione, Dra. Kelly Yoshizaki, Luís Fernando Amato Lourenço e Dra. Tiana Moreira.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo: Dra. Lin Hui Tzu Wang, Prof. Dr. Mario H. Hirata, Gisele Bastos, Jéssica Bassani Borges e Thiago Dominguez Hirata.

A todos os colaboradores do Laboratório de Investigação Médica 5 e do

Laboratório de Investigação Médica 34 pela colaboração e amizade.

Aos professores examinadores da minha banca de qualificação: Prof. Dr. Heráclito Barbosa de Carvalho, Profa. Dra. Carolina Fu e a Dra. Iracema loco Kikuchi Umeda pelas sugestões que me ajudaram a melhorar minha dissertação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação DA Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela assistência prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos mais que especiais Caren Dias, Carla Cardilo, Allan Beas e Reginaldo Silva obrigada pelo carinho e por torcerem sempre por mim e sempre me incentivando para conclusão deste trabalho.

As minhas queridas chefes Maria Cecilia dos Santos, Denise Vianna Ayres e Carla Paschoal por terem me dado essa oportunidade e por facilitarem a conclusão do meu projeto.

À minha família que acompanhou em todos os momentos, sempre me apoiaram e me deram força para prosseguir.

E principalmente, a todos voluntários que participaram do nosso estudo, sem vocês não seria possível concluir esse trabalho.

Muito obrigada a todos vocês, não seria nada se não tivesse o apoio e a ajuda de todos.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Mecanismo de defesa do sistema respiratório em indivíduos normais.....	2
1.2 Mecanismo de defesa do sistema respiratório em tabagistas.....	8
1.3 Mecanismo de defesa do sistema respiratório e cessação do tabagismo.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
3. MÉTODO.....	18
3.1 Casuística.....	18
3.2 Avaliação.....	19
3.2.1 Questionário geral.....	20
3.2.2 Exame físico.....	20
3.2.3 Análise do transporte mucociliar nasal por meio do teste de trânsito da sacarina.....	21
3.2.4 Coleta do muco nasal e análise das propriedades físicas.....	22
3.2.5 Coleta do lavado nasal.....	25
3.3 Contagem das células totais e células diferenciadas do LN.....	26
3.4 Quantificação de citocinas e cotinina no LN.....	26
3.5 Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	29

5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	49
7. ANEXOS.....	50
8. REFERÊNCIAS.....	55
9. APÊNDICES.....	67

Apêndice 1. Artigo publicado na revista científica CLINICS (Fator de Impacto: 0,93) sob o título: *The effects of smoking and smoking cessation on nasal mucociliary clearance, mucus properties and inflammation*. Utiyama DMOU, Yoshida CT, Goto DM, Carvalho TS, Santos UP, Koczulla AR, Saldiva PHN, Nakagawa NK. Doi: 10.6061/clinics/2016(06)10

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

~	Aproximadamente
O	Grau
OC	Grau Celsius
%	Porcentagem
AC	Ângulo de contato
ATP	Trifosfato de adenosina
bpm	Batimentos por minuto
Cl-	Íons cloreto
cm	Centímetro
CO	Monóxido de carbono
DP	Desvio Padrão
DPOC	Doença obstrutiva crônica
FC	Frequência cardíaca
g	Grama
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
<i>IQR</i>	<i>Interquartile range</i> ou Variação de quartis 25-75%
K+	Íons potássio
l	Litro
LN	Lavado nasal
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitro
ml/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
Na+	Íons sódio
ng/ml	Nanograma por mililitro

PAS	Pressão arterial sistêmica
PAD	Pressão arterial diastólica
pg/ml	Picograma por mililitro
ppm	Partes por milhão
rpm	Respirações por minuto
TMC	Transporte mucociliar
STT	Teste de trânsito de sacarina
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
vs	Versus

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados demográficos e características clínicas de tabagistas e cessadores no início do estudo. Os valores estão apresentados como média $\pm$ DP ou número de casos e proporção	29
Tabela 2	Análise descritiva dos valores de CO exalado (ppm) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	30
Tabela 3	Análise descritiva dos valores de STT (min) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	31
Tabela 4	Análise descritiva dos valores de transportabilidade do muco (mm) por alto fluxo de tabagistas e cessadores ao longo do estudo	32
Tabela 5	Análise descritiva dos valores do ângulo de contato do muco ($^{\circ}$) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	33
Tabela 6	Análise descritiva dos valores de cotinina (ng/ml) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	34
Tabela 7	Análise descritiva dos números das células totais em LN de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	35
Tabela 8	Análise descritiva dos números de neutrófilos em LN de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	35
Tabela 9	Análise descritiva dos números de linfócitos de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	36
Tabela 10	Análise descritiva dos números de macrófagos de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	36
Tabela 11	Análise descritiva dos números de células ciliadas de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	36
Tabela 12	Análise descritiva dos números de células caliciformes de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	37
Tabela 13	Análise descritiva das concentrações de IL-6 (pg/ml) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	37
Tabela 14	Análise descritiva das concentrações de IL-8 (pg/ml) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo	37
Tabela 15	Análise comparativa do número total de células inflamatórias e células epiteliais e concentrações de citocinas no LN entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo	38

Tabela 16 Revisão da média dos valores do teste de trânsito da 42
sacarina em tabagistas e não tabagistas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático do transporte mucociliar adaptado de Nakagawa NK (Dissertação de Mestrado de Naomi K. Nakagawa, 1997)	4
Figura 2	Fases do batimento ciliar. A: batimento ciliar efetivo; B: batimento ciliar de recuperação (Adaptado de Nakagawa <i>et al.</i> , 2006)	5
Figura 3	Corte transversal de um cílio normal por meio de micrografia eletrônica (aumento de 84.000x) revelando um par central de microtúbulos cercado por nove pares de microtúbulos laterais (Adaptado de Macchione e Saldiva, 2006)	5
Figura 4	Desenho esquemático do transporte iônico e de água no epitélio respiratório. (Adaptado de Nakagawa <i>et al.</i> , 2006). ADP, difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; A, membrana apical; BL, membrana basolateral; Na ⁺ , íons sódio; K ⁺ , íons potássio; Cl ⁻ , íons cloreto	7
Figura 5	Desenho longitudinal do estudo	19
Figura 6	Avaliação do tabagismo e da cessação do tabagismo por meio de análise do monóxido de carbono exalado	21
Figura 7	Avaliação do teste de trânsito da sacarina: inserção de grânulos de sacarina na narina livre	22
Figura 8	Coleta do muco nasal com ajuda de um pincel com cerdas macias	24
Figura 9	Equipamento para análise da transportabilidade por alto fluxo	24
Figura 10	Equipamentos para análise do ângulo de contato do muco. A: foco de luz multidirecional, B: estereomicroscópio, C: câmera conectada ao estereomicroscópio e ao computador, D: computador com o programa Axiovision de análise de imagem, E: determinação do ângulo por meio de uma reta na superfície da lâmina e outra reta na superfície do muco após cinco minutos de depósito sobre a lâmina (Dissertação de Mestrado de Michelle L. Franchini, 2016)	26
Figura 11	Coleta de lavado nasal. A: instilação de soro fisiológico 0,5% por meio de uma seringa em uma das narinas e B: coleta do lavado em frasco estéril	27
Figura 12	Análise comparativa da concentração de CO exalado entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo	33

Figura 13	Análise comparativa dos valores do STT entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo	34
Figura 14	Análise comparativa dos valores da transportabilidade do muco por alto fluxo entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo	35
Figura 15	Análise comparativa das concentrações de cotinina em LN entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo	36

RESUMO

Utiyama DMOU. *Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo nos mecanismos de defesa das vias aéreas, propriedades do muco e inflamação nasal* [dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

O tabagismo é um problema mundial de saúde pública e é considerado a principal causa de morte evitável no mundo associado com câncer de pulmão, doença pulmonar obstrutiva crônica e infarto agudo do miocárdio. O tabagismo induz alterações morfológicas e funcionais no sistema respiratório. O transporte mucociliar (TMC) é um dos principais mecanismos de defesa do sistema respiratório que pode ser alterado com a fumaça e outros produtos do cigarro. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo no TMC nasal, nas propriedades do muco e sobre marcadores inflamatórios. Trinta e três indivíduos tabagistas foram incluídos no estudo após concordância com o termo de consentimento livre e esclarecido. O recrutamento de voluntários foi realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e no Ambulatório de Cessação do Tabagismo da Disciplina de Pneumologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. As variáveis desfecho foram o TMC nasal analisado por meio do teste de trânsito da sacarina, as propriedades do muco por meio do ângulo de contato e da transportabilidade da tosse por alto fluxo e a quantificação de células inflamatórias e concentração de interleucinas (IL)-6 e IL-8 em lavado nasal. Vinte cessadores (idade média: 51 anos, 9 do sexo masculino) foram avaliados no tempo basal do estudo, 1º mês, 3º mês e 12º mês de cessação do tabagismo e 13 tabagistas (média de idade: 52 anos, 6 do sexo masculino) foram avaliados no

tempo basal e 12 meses após o basal. As características demográficas, hábito *tabágico* inicial e morbidades de tabagistas e de cessadores foram similares. No tempo basal do estudo, os tabagistas e cessadores apresentaram disfunção do TMC nasal ($17,9 \pm 10,1$ min e $17,4 \pm 7,7$ min, respectivamente, $p=0,880$). A cessação do tabagismo induziu melhora significativa do TMC nasal no 1º mês, 3º mês e 12º mês em 63%, 76% e 85% dos indivíduos, respectivamente. Somente aos 12 meses, foi possível observar melhora na transportabilidade do muco por alto fluxo (~ 23%), porém com aumento do número de macrófagos (2x) em lavado nasal. Não observamos alterações no ângulo de contato do muco e nas concentrações de citocinas em lavado nasal. Concluímos que a cessação do tabagismo induz melhora rápida no TMC nasal, porém melhora nas propriedades do muco foi observada somente após 12 meses de cessação do tabagismo.

Descritores: Hábito de fumar, parar hábito de fumar, depuração mucociliar, muco nasal, inflamação nasal, lavado nasal

ABSTRACT

Utiyama DMOU. *The effects of smoking and smoking cessation on nasal mucociliary clearance, mucus properties and nasal inflammation* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Smoking is a health problem in the world. It is considered a main cause of preventable death and is associated with lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease and myocardium infarction. Smoking induces morphological and functional changes in the respiratory system. Mucociliary clearance (MCC) is one of the main defense mechanisms of the respiratory system that can be affected by smoke and other cigarette products. The aim of this study was to assess the effects of smoking and smoking cessation on nasal MCC, mucus properties and inflammatory biomarkers. Thirty three smokers were included in this study after agreement with the written informed consent. Subject's recruitment was performed at Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) and Ambulatório de Cessao do Tabagismo da Disciplina de Pneumologia do Hospital das Clnicas da FMUSP. The outcome variables were nasal MCC evaluated by saccharin transit test, mucus properties using contact angle and mucus transportability by high airflow and quantification of inflammatory cells number and interleukin (IL)-6 and IL-8 in the nasal lavage fluid. Twenty volunteers in the smoking cessation program (mean age: 51 years, 9 male) were assessed at baseline, month 1, month 3 and month 12 after of the smoking cessation and 13 smokers (mean age: 52 years, 6 male) were assessed at baseline and 12 months after baseline. Demographic characteristics, smoking history and morbidities were similar between the two groups. At baseline, smokers showed impaired nasal MCC (17.9 ± 10.1 min and 17.4 ± 7.7 min, respectively, $p=0.880$). Smoking cessation significantly improved nasal MCC at 1 month, 3 months

and 12 months in 63%, 76% and 85% of the subjects, respectively. Only after 12 months of smoking cessation, improvement in mucus transportability by high airflow (~ 23%) was observed, however, with increased number of macrophages (2-fold) in nasal lavage fluid. No changes were observed in mucus contact angle and cytokines concentrations in nasal lavage fluid. We concluded that smoking cessation induces rapid improvement in nasal MCC, however, improvement in mucus properties were observed only after 12 months of smoking cessation.

Descriptions: smoke, smoke cessation, mucociliar clearance, nasal mucus, nasal inflammation, nasal lavage fluid

1. INTRODUÇÃO

O uso do tabaco pelo homem começou com fins medicinais e rituais religiosos a cerca de 1.000 anos antes de Cristo na América Central como forma de purificar, proteger e fortalecer os guerreiros das tribos. Na época do descobrimento da América, observou-se que os nativos já cultivavam o hábito de fumar tabaco enrolado em folhas, e esse hábito se espalhou rapidamente na Europa (Hortense *et al.*, 2008). No final do século XIX, o tabagismo e a indústria de cigarros se firmaram e o setor industrial foi dominado pelas multinacionais. Nos Estados Unidos da América, entre 1904 e 1947, as indústrias de cigarros cresceram mais rapidamente que as indústrias de carros (Moreira *et al.*, 1995; Boeira e Guivant, 2003) e na década de 70, o cigarro foi visto como um acessório elegante de moda. E finalmente, no início do século XXI o tabagismo é reconhecido como fator de risco para o desenvolvimento de doenças respiratórias e cardiovasculares e óbito (Doll e Hill, 1950; Doll *et al.*, 2004). Em 1997, o tabagismo é classificado como doença dentro do Código Internacional de Doenças como CID-Z72-0 pela Organização Mundial de Saúde. Em 2008, o tabagismo foi considerado a principal causa de morte evitável no mundo (WHO, 2008) associado com 90% de casos de câncer de pulmão, 80% de casos de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e 33% de casos de infarto agudo do miocárdio (Fiore *et al.*, 2008; Celli, 2008; Reichert *et al.*, 2008). Na última década, observou-se um declínio da prevalência mundial de fumantes de 35% para 22% (Middleton e Morice, 2000), porém ainda se estima que haverá cerca de 1,6 bilhões de tabagistas em 2030 (WHO, 2008). No Brasil, em 2008 se estimou que cerca de 130.000 mortes/ano estavam associadas ao tabagismo, representando 13% do total de óbitos, valor que superou a estimativa internacional de 10% de

mortes atribuíveis ao tabagismo em 2015. Os custos do tratamento das doenças relacionadas ao tabagismo foram de R\$ 21 bilhões em 2011 para os sistemas de saúde público e suplementar (Mendes *et al.*, 2016).

Entre os componentes da fumaça e do cigarro, há cerca de 4.720 substâncias químicas diferentes e várias delas tóxicas e entre elas o monóxido de carbono (CO), a nicotina, a amônia, o acetato de chumbo, o formol, a pólvora, o cádmio, a naftalina, o fósforo, a acetona e o butano (Boeira e Guivant, 2003). O CO, quando inalado, combina-se com a hemoglobina sanguínea formando a carboxi-hemoglobina que interfere na habilidade do organismo de carregar e utilizar o oxigênio (Boeira e Guivant, 2003). A nicotina tem uma meia vida de 2 horas (Benowitz, 1988) e é a substância que causa maior dependência química, sendo que surgem os primeiros sintomas de abstinência após 6 a 8 horas de interrupção do uso. A nicotina é rapidamente absorvida pelos alvéolos pulmonares, entra na corrente sanguínea e é transportada até o sistema nervoso central, onde se liga aos receptores colinérgicos nicotínicos, aumentando a liberação de diversos neurotransmissores notadamente a dopamina nos neurônios do sistema límbico-cortical (Guyton e Hall, 2006). Além da ação no sistema nervoso central, a nicotina estimula as glândulas suprarrenais que, por sua vez, liberam adrenalina. A adrenalina resulta em aumento da pressão arterial, da frequência respiratória e da frequência cardíaca.

1.1 Mecanismos de defesa do sistema respiratório em indivíduos normais

O epitélio das vias aéreas de mamíferos é pseudo-estratificado e composto por muitos tipos morfológicos de células com distintas funções, como as células ciliadas e as células caliciformes e a membrana basal reticular. No sub-epitélio existe uma

lâmina própria elástica com microvasos (diâmetro abaixo de 50 μm), feixes nervosos entre outros. Na sub-mucosa, há glândulas produtoras de muco, células musculares e cartilagem sobre uma fina camada adventícia. Há também as células livres do sistema imune que participam da defesa como por exemplo neutrófilos, macrófagos e linfócitos

O transporte mucociliar (TMC) que é o principal mecanismo de defesa que protege o sistema respiratório contra partículas inaladas e microorganismos. O TMC é composto de basicamente de três componentes: estrutura ciliar e batimento ciliar, propriedades físicas e quantidade de muco respiratório e interação muco-cílio (Nakagawa *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2006). O TMC transporta os agentes inalados que ficam retidos no muco para a região de orofaringe (Fig. 1) onde será deglutido ou expectorado. A eficiência do TMC depende da integridade da membrana, da estrutura e do número de cílios, da organização e batimento dos cílios, da quantidade e composição do muco e do acoplamento muco-cílio. As disfunções do TMC contribuem para a inflamação e obstrução das pequenas vias aéreas (Cosio e Hale, 1980), aumentam a susceptibilidade às infecções respiratórias (Konrad *et al.*, 1994; Prescott e Lange, 1995), doenças pulmonares, disfunção crônica e progressão de doenças respiratórias (Meyer, 2004).

Figura 1. Desenho esquemático do transporte mucociliar adaptado de Nakagawa NK (Dissertação de Mestrado de Naomi K. Nakagawa, 1997)

Cada célula ciliada possui aproximadamente 200 cílios na superfície apical (cada cílio tem de 5 a 50 μm de altura) com corpúsculos basais que possuem mitocôndrias que fornecem trifosfato de adenosina (ATP) para o batimento ciliar, realizado em dois movimentos ciliares (Fig. 2): (a) batimento efetivo onde o topo do cílio carrega o muco respiratório na direção da orofaringe e (b) batimento de recuperação quando o cílio se curva e retorna dentro do líquido periciliar para reiniciar o batimento efetivo. Cada cílio é formado por 9 pares de túbulos dispostos ao redor de um par central (Fig. 3) O número e a altura dos cílios vão reduzindo das células ciliadas de vias aéreas superiores para as células vias aéreas inferiores (Junqueira e Carneiro, 2008; Nakagawa *et al.*, 2006). Doenças respiratórias podem induzir a perda do número de cílios, alteração estrutural ou disfunção do batimento ciliar ou mesmo paralisia ciliar (Verra *et al.*, 1995; Tamashiro *et al.*, 2009).

Figura 2. Fases do batimento ciliar. A: batimento ciliar efetivo; B: batimento ciliar de recuperação (Adaptado de Nakagawa *et al.*, 2006).

Figura 3. Corte transversal de um cílio normal por meio de micrografia eletrônica (aumento de 84.000x) revelando um par central de microtúbulos cercado por nove pares de microtúbulos laterais (Adaptado de Macchione e Saldiva, 2006)

O muco respiratório tem como função lubrificar e umidificar as vias aéreas, isolar e proteger o epitélio de agentes inalados assim como de remover agentes nocivos por meio do TMC. O muco é um fluido viscoelástico que consiste basicamente de água (95%), lipídios, peptídeos e proteínas, entre elas as mucinas (Fahy e Dickey, 2014). As mucinas são constituídas por moléculas glicosiladas

(glicoproteínas) de alto peso molecular que contribui para a viscosidade e solubilidade do muco.

O muco é composto por duas camadas: (a) camada periciliar, que recobre os cílios de forma contínua e (b) o muco propriamente dito. Os adultos normais, produzem em média 10 ml de muco em 24 horas. O aumento da produção de muco e alterações das propriedades físicas do muco podem induzir à estase desse fluido no trato respiratório (Nakagawa *et al.*, 2000), o que aumenta a área e o tempo de contato do epitélio respiratório com microorganismos e outros agentes agressores, predispondo os indivíduos à infecção do trato respiratório, particularmente a pneumonia, o que pode aumentar a morbidade e a mortalidade dos indivíduos (Konrad *et al.*, 1995; Meyer, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005).

A quantidade e a composição do muco dependem do transporte de água e íons no epitélio respiratório (Nakagawa *et al.*, 2006; Button e Boucher, 2008) que normalmente ocorrem por meio de dois mecanismos (Fig. 4): um determinado pela (1) absorção de sódio (Na^+) e outro determinado pela (2) secreção de cloro (Cl^-). A bomba NaKTPase está localizada na membrana basolateral e transporta 3 Na^+ para a luz das vias aéreas (saída de Na^+) e 2 K^+ para dentro, o que gera um gradiente eletroquímico negativo permitindo a entrada de 1 Na^+ por meio de canal específico de Na^+ , localizado na membrana apical (absorção de Na^+). Simultaneamente, o co-transportador NaK2Cl transporta para dentro da célula 1 Na^+ , 1 K^+ e 2 Cl^- pela membrana basolateral e cria um gradiente favorável à saída de Cl^- na membrana apical por meio de canal específico de Cl^- .

Figura 4. Desenho esquemático do transporte iônico e de água no epitélio respiratório adaptado de Nakagawa *et al.* (2006). ADP, difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; A, membrana apical; BL, membrana basolateral; Na^+ , íons sódio; K^+ , íons potássio; Cl^- , íons cloreto

Muitas células estão envolvidas na resposta imune básica e adquirida como por exemplo as células epiteliais (ciliadas), os macrófagos, os neutrófilos e os linfócitos (Rodrigues *et al.*, 2014). Os neutrófilos e os macrófagos são células de defesa produzidas pelo timo e pela medula óssea (Janeway *et al.*, 2014).

Macrófagos, neutrófilos e linfócitos assim como células do endotélio e do epitélio podem secretar citocinas que são proteínas mediadoras de muitas funções celulares que podem agir local ou sistemicamente. As citocinas são produzidas transitoriamente em resposta à presença de microorganismos e outros antígenos. Na imunidade natural, as citocinas são produzidas por macrófagos e células *natural-killers* e medeiam a resposta inflamatória inicial e promovem a eliminação de

microorganismo, como por exemplo, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL)-6 e IL-8. O TNF- α é produzido por células natural-killers, macrófagos ou linfócitos e pode induzir à apoptose e/ou estimulação de recrutamento de neutrófilos em endotélio vascular. A IL-8 é produzida principalmente por monócitos e células epiteliais e sua principal ação é estimular a migração de neutrófilos para o endotélio (Yamamoto *et al.*, 1997). Na imunidade adquirida, as citocinas estimulam o crescimento (proliferação) e a diferenciação de linfócitos e ativam diferentes células especializadas, onde se ligam a receptores de membrana específicos dessas células. A secreção de IL-6 é realizada pelas células fagocitárias mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos e linfocitárias T. A IL-6 é considerada um dos principais mediadores da inflamação na fase aguda (Noah *et al.*, 2011). Outras citocinas estão relacionadas com a proliferação e diferenciação de linfócitos com a IL-4 e a IL-10 (Kunz *et al.*, 2011). A IL-10 é produzida principalmente pelos macrófagos ativados e células T e é um regulador de feedback negativo.

As citocinas da imunidade natural e adquirida são produzidas por populações celulares diversas com células-alvo diversas, no entanto, uma citocina pode ser produzida em ambas situações, natural ou adquirida, assim como diferentes citocinas produzidas durante cada situação podem ter ações aditivas.

1.2 Mecanismos de defesa do sistema respiratório e tabagismo

Agudamente, a inalação da fumaça e outros produtos do cigarro pode produzir alterações precoces de estrutura celular e de função do sistema respiratório. Vários estudos com animais e humanos mostram indução ao estresse oxidativo, à resposta inflamatória, à lesão do epitélio respiratório, particularmente

sobre as células ciliadas, à morte e regeneração celular (Floreani e Rennard, 1999; Wang *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2016; Amatngalim *et al.*, 2016) com a inalação de fumaça e de outros produtos do cigarro. Quanto ao TMC, o estímulo agudo induz ao aumento da produção de muco para a remoção dos agentes agressores assim como induz ao aumento do recrutamento de células ciliadas e da frequência de batimento ciliar. Tamashiro *et al.* (2009) mostraram em cultura de células epiteliais de ratos que 15 dias de exposição à fumaça do cigarro compromete o processo de ciliogênese que ocorre de 10 a 14 dias, com redução de área ciliada (90 ± 8 basal x 38 ± 12 % da área após 15 dias de exposição) com possível prejuízo do TMC. Zhou *et al.* (2009) compararam a frequência de batimento ciliar em biópsia do epitélio nasal de indivíduos sem doenças respiratórias não tabagistas (~26 anos) e tabagistas passivos (~26 anos) e tabagistas ativos (~ 35 anos). Os autores observaram similaridade na frequência do batimento ciliar entre os indivíduos não tabagistas (~ 7,28 Hz) e tabagistas passivos (~7,81 Hz). Os jovens tabagistas apresentaram aumento da frequência de batimento ciliar de 10 a 17% (~8,54 Hz) que foi considerado um dos primeiros efeitos fisiológicos da exposição do epitélio respiratório à exposição fumaça e outros produtos do cigarro. Corroborando esses resultados, Nicola *et al.* (2014) observaram por meio do teste de trânsito da sacarina (STT) que jovens (19 a 24 anos) sem doenças respiratórias (“saudáveis”) e tabagistas (carga tabágica ≤ 3 maços-ano) apresentam uma aceleração do TMC nasal (STT= $5,9 \pm 3,1$ minutos) em comparação com jovens não tabagistas ($7,7 \pm 4,1$ minutos). Os autores discutiram que essa resposta de aceleração do TMC nasal em jovens tabagistas “saudáveis” provavelmente foi devida ao aumento da frequência de batimento ciliar, considerada uma resposta protetora à inalação da

fumaça e de produtos do cigarro. Entretanto, outros estudos com tabagistas adultos mostram função de TMC dentro da faixa de normalidade (≤ 12 min). Littlejohn *et al.* (1992) avaliaram o TMC nasal por meio do STT mensurado na narina não congestionada como na narina congestionada ($\sim 11,7$ e $10,4$ min, respectivamente). Porém, esse estudo tem limitações porque a idade e a carga tabágica dos indivíduos não foram descritos e esses fatores são independentes em relação ao desfecho STT (Oliveira-Maul *et al.*, 2013).

Além do TMC, outros biomarcadores não invasivos podem ser utilizados para avaliar o efeito do tabagismo sobre mecanismos de defesa do sistema respiratório. Em tabagistas jovens, Miert *et al.* (2011) compararam em lavado nasal (LN), a quantidade de CC16 uma proteína marcadora de produção de muco por célula de Clara (em ppb) e com papel anti-inflamatório e em ar exalado a quantidade de óxido nítrico de jovens (idade média de 16 anos) divididos em tabagistas com carga tabágica < 5 cigarros/dia ou $\sim 0,08$ maço-ano e tabagistas com carga tabágica ≥ 5 cigarros/dia ou $\sim 0,35$ maço-ano. Os tabagistas com maior carga tabágica mostraram níveis reduzidos de óxido nítrico em ar exalado comparados com tabagistas de menor carga tabágica (8,9 ppb e 15,2 ppb, respectivamente) e de concentração de CC16 em LN (11,2 μg e 28,7 μg , respectivamente). Esses resultados mostram que mesmo uma baixa carga tabágica (< 1 maço-ano) pode causar alterações precoces nas vias aéreas de jovens, consideradas de certa forma como fases pré-clínicas de desenvolvimento de doenças. Por outro lado, Sayiner *et al.* (2013) mostraram presença de bronquiolite (doença em pequenas vias aéreas) em tomografia computadorizada torácica de mulheres jovens entre 20 e 30 anos tabagistas ($\sim 8 \pm 4$ maços-ano) quando comparadas com não tabagistas (~ 41 vs

15%, respectivamente) assim como aumento da concentração de IL-6 no plasma ($1,54 \pm 0,66$ e $2,22 \pm 0,46$ pg/ml, respectivamente). Houve correlação positiva entre carga tabágica e gravidade da bronquiolite.

Em indivíduos com idade média de 50 anos, Proença *et al.* (2012) compararam o STT de não tabagistas e de tabagistas com carga tabágica leve (≤ 15 cigarros/dia), moderada (16-25 cigarros/dia) e intensa (> 25 cigarros/dia). Os autores observaram valores de STT similares entre indivíduos não tabagistas (~ 8 a 11 min) e tabagistas com carga tabágica leve (~ 7 a 11 min) assim como um prolongamento do STT em tabagistas com carga tabágica moderada e intensa (~ 11 a 17 min e ~ 10 a 21 min, respectivamente). Os autores discutiram que provavelmente o grau de exposição diária aos produtos do cigarro não tenha sido suficiente para causar danos estruturais e prejudicar o TMC do grupo de carga tabágica leve.

No tabagismo crônico, a exposição à fumaça e aos outros produtos do cigarro promovem perpetuação de processos lesivos ao epitélio (estresse oxidativo, inflamação, morte celular e regeneração), o que pode favorecer o desenvolvimento de doenças respiratórias crônicas inclusive com perda de função pulmonar, como na DPOC. Leopold *et al.* (2009) mostraram que em cultura de células brônquicas de tabagistas com idade média de 44 anos e carga tabágica de 33 maços-ano induz redução do comprimento dos cílios em aproximadamente 10% quando comparados com indivíduos não tabagistas. A redução do comprimento dos cílios pode resultar em uma inadequação da interação muco-cílio e redução do TMC (Verra *et al.*, 1995).

Além de alteração estrutural dos cílios e da função, o tabagismo crônico pode promover anormalidades na composição e na produção do muco (Fahy e Dickey, 2014). Em tabagistas com idade entre 24 e 79 anos, com câncer ou sem câncer de

pulmão, Zayas *et al.* (1990) observaram que o muco traqueal tem alteração da reologia (deformação do fluido frente a força) e redução da sua transportabilidade por cílio e por alto fluxo (tosse). Os autores levantaram a possibilidade da exposição à fumaça e outros produtos do cigarro levar a alterações nas propriedades do muco primeiramente como defesa do sistema respiratório, mas que essas alterações cronicamente podem, representar um risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão em indivíduos tabagistas.

Em tabagistas assintomáticos (~45 anos) com carga tabágica de ~17,5 maços-ano e não tabagistas (~33 anos), Rubin *et al.* (1992) analisaram as propriedades do muco traqueal coletado por meio de um tubo endotraqueal quanto à viscoelasticidade, a hidratação do muco, a transportabilidade do muco por cílio e transportabilidade pela tosse. Os indivíduos tabagistas comparados com indivíduos não tabagistas apresentaram maior produção de muco (18,6 vs 11,2 mg, respectivamente), assim como um muco com menor concentração de sólidos (11,5 vs 16,3 %, respectivamente), menor viscoelasticidade (0,37 vs 0,41 Hz, respectivamente) e maior transportabilidade por cílio (1,47 vs 0,85 de velocidade relativa em palato de rã, respectivamente). Não houve alteração na transportabilidade do muco traqueal por meio da tosse. Os autores mostraram que essas respostas podem estar associadas com mecanismos de defesa da aérea à inalação de fumaça e outros produtos do cigarro.

1.3 Mecanismos de defesa do sistema respiratório e cessação do tabagismo

A cessação do tabagismo é a melhor estratégia para restaurar mecanismos de defesa, evitar doenças respiratórias e complicações, melhorar a DPOC (Celli,

2008) e reduzir o risco cardiovascular e a mortalidade associada ao tabagismo (Doll *et al.*, 2004; Anthonisen *et al.*, 2005; Halvorsen *et al.*, 2007; Decramer *et al.*, 2008).

Em tabagistas asmáticos com idade média de 49 anos, o período de seis semanas de cessação do tabagismo se mostrou suficiente e fundamental para a melhora da função pulmonar observada por meio do volume expirado no primeiro segundo (delta= ~ 407 ml) e redução do número de neutrófilos em escarro induzido. Esses resultados mostram que há redução de inflamação em vias aéreas e reversibilidade funcional pulmonar (Chaudhuri *et al.*, 2006). Em um período de 12 meses de cessação do tabagismo, Willemse *et al.* (2005) observaram uma redução da inflamação analisada por meio concentração de moléculas de adesão em biopsia brônquica e concentração celular de linfócitos e neutrófilos e concentração de IL-8 em escarro de tabagistas assintomáticos (~50 anos) em comparação com tabagistas com DPOC (~55 anos) que mantiveram inflamação brônquica ou até mesmo mostraram piora do quadro. Essa resposta inflamatória após a cessação do tabagismo em indivíduos com DPOC foi discutida pelos autores como um possível efeito de reparo da lesão tecidual, porém ainda um efeito a ser esclarecido se benéfico ou deletério.

Pagliuca *et al.* (2015) compararam o TMC nasal observado por meio do STT, a proporção do número de células ciliadas e de células caliciformes em escovado nasal por meio de microscopia ótica (100x) e o batimento ciliar por meio de microscopia com contraste de fase (1000x de aumento) em indivíduos não tabagistas, indivíduos tabagistas e cessadores do tabagismo. Os pesquisadores observaram aumento significativo do STT de tabagistas quando comparado com não tabagistas (~15,6 min x 11,7 min, respectivamente, $p < 0,001$) e cessadores (~15,6

min e 11,8 min, respectivamente, $p=0,004$). Em tabagistas comparados com indivíduos não tabagistas e cessadores, a proporção de células produtoras de muco foi maior e o batimento ciliar foi menor assim como a viabilidade da célula ciliada (4,5, 12,8 e 13,0 horas, respectivamente, $p<0,001$). Ramos *et al.* (2001) observaram que a partir de 15 dias de cessação do tabagismo em indivíduos sem DPOC (~ 54 anos) com carga tabágica de 20 ± 9 maços-ano há melhora do TMC nasal basal até 180 dias.

Em conjunto, esses estudos mostram que há melhora do TMC após cessação do tabagismo, porém, os mecanismos ainda foram pouco explorados, particularmente o muco respiratório. Se a cessação do tabagismo induzir melhora do STT, podemos hipotetizar que essa melhora possa estar associada à eliminação/redução da inflamação crônica e regeneração do epitélio ciliado, o que pode restaurar o número de células ciliadas, a estrutura dos cílios e o batimento ciliar. Dessa forma, pretendemos avaliar os efeitos da cessação do tabagismo sobre o STT, as propriedades do muco e inflamação nasal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 1) Caracterizar o TMC nasal, propriedades físicas e de transportabilidade do muco, celularidade e concentração de citocinas em LN de indivíduos tabagistas;
- 2) Avaliar se a cessação do tabagismo afeta o TMC nasal, as propriedades do muco, a celularidade e a concentração de citocinas em LN após 1 mês, 3 meses e 12 meses; e
- 3) Comparar o TMC nasal, propriedades do muco, celularidade e citocinas em LN de indivíduos tabagistas e cessadores do tabagismo após um período de 12 meses.

3. MÉTODOS

Este estudo longitudinal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP 235/14 – ANEXO A). E está registrado no [clinical.trials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT02136550). Os voluntários foram incluídos após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (ANEXO B).

3.1 Casuística

Foram recrutados para o estudo voluntários tabagistas:

- a) do Ambulatório de Cessação do Tabagismo da Divisão de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina do Estado de São Paulo e que foram admitidos no Programa de Cessação do Tabagismo (grupo denominado de cessadores).
- b) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (grupo denominado tabagistas).

Os critérios de exclusão foram: (a) incapacidade de sentir o gosto da sacarina, (b) cirurgia ou trauma prévia no nariz, (c) infecção respiratória nos 30 dias anteriores à entrada no estudo.

Os indivíduos foram avaliados no Laboratório de Defesa Pulmonar na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo das 7 às 12 horas. Os tabagistas e os cessadores foram avaliados no tempo basal e após 12 meses. Os cessadores também foram avaliados no 1º e no 3º mês (Fig. 5).

Os voluntários foram convidados a evitar a ingestão de café / chá / álcool e vegetais verde pelo menos 12 horas antes da avaliação. Pedimos também para que

os tabagistas ficassem sem fumar pelo menos 2 horas antes das medições.

Os tabagistas foram classificados como indivíduos que fumaram ≥ 100 cigarros na vida e que atualmente fumam pelo menos um cigarro por dia, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Saúde. Indivíduos inscritos no Programa de Cessação do Tabagismo tinham uma combinação de aconselhamento e medicamentos (terapia de reposição de nicotina, administração de bupropiona e/ou nortriptilina) ao longo de 3 meses.

Figura 5. Desenho longitudinal do estudo

3.2 Avaliação

Na avaliação os indivíduos foram orientados a sentar em uma cadeira e foi realizada anamnese clínica por meio de um questionário de história de saúde geral, exame físico após 10 min de descanso, coleta de monóxido de carbono e coleta de fluidos (muco e lavado nasal) (ANEXO C).

3.2.1 Questionário geral

Foram obtidas informações sobre o histórico de saúde, antecedentes pessoais, medicamentos de uso, internações prévias e histórico de tabagismo por meio de um questionário semi-estruturado.

3.2.2 Exame físico

Após o preenchimento do questionário os indivíduos permaneceram sentados para a coleta dos seguintes dados:

- (a) Pressão arterial sistólica e diastólica (mmHg) foi aferida com um esfigmomanômetro e um estetoscópio (Classic II, Littman Ind., Minnesota, USA) no membro superior esquerdo
- (b) Frequência cardíaca (bpm) e saturação periférica de oxigênio (%) foram aferidas com auxílio de um oxímetro de pulso (Modelo CMS 50D, Oled Ind., Hebei, China) no dedo indicador direito até estabilização
- (c) Frequência respiratória (rpm) aferida pela contagem de excursões torácicas durante um minuto.
- (d) CO exalado foi aferido com um microanalisador (Cardinal Health U.K. 232 Ltd., Chatham, UK): os indivíduos foram instruídos a realizar uma inspiração profunda, manter uma pausa inspiratória de aproximadamente 20 segundos, e em seguida, realizar uma expiração lenta (15 a 20 segundos) por meio de um bocal conectado ao microanalisador. Os resultados do CO exalado foram expressos em ppm. A cessação do tabagismo foi considerada se CO exalado <10 ppm e/ou se os níveis de cotinina no LN < 10 ng/mL (Nicola *et al.*, 2014) (Fig. 6).

Figura 6. Avaliação do tabagismo e da cessação do tabagismo por meio de análise do monóxido de carbono exalado

3.2.3 Análise do transporte mucociliar nasal por meio do teste de trânsito da sacarina

O teste de trânsito da sacarina (STT) consiste na observação direta do TMC nasal *in vivo*. O STT é um método simples, de baixo custo e acessível (Oliveira-Maul *et al.*, 2013; Nicola *et al.*, 2014). O valor de referência normal para indivíduos adultos saudáveis descrito como igual ou abaixo de 12 minutos (Oliveira-Maul *et al.*, 2013).

Para a realização do STT, os indivíduos foram avaliados em uma sala com temperatura média de 21-23°C e umidade relativa média entre 63 e 71%. Solicitamos ao indivíduo uma leve extensão cervical e em seguida, depositamos uma pequena quantidade de sacarina (2,5 mg) introduzida por meio de um canudo plástico (2 mm de diâmetro e 5 cm de comprimento) (Oliveira-Maul *et al.*, 2103;

Nicola *et al.*, 2014) e posicionada 2 cm na superfície inferior da narina de fluxo aéreo livre. Pedimos para os indivíduos retornarem a cabeça para posição inicial e acionamos o cronometro, pedimos também para eles evitarem respirações profundas, tosse, espirros, cheirar ou falar durante o teste e nos avisasse na primeira percepção de um sabor diferente na boca.

Se o indivíduo não sentir o gosto após 60 minutos da colocação da sacarina na narina, o procedimento foi interrompido e um grânulo de sacarina foi colocado na ponta da língua para assegurar o mesmo que fosse capaz de sentir o gosto da sacarina (Fig. 7).

Figura 7. Avaliação do teste de trânsito da sacarina: inserção de grânulos de sacarina na narina livre

3.2.4 Coleta do muco nasal e análise das propriedades físicas

Após a realização do STT, coletamos o muco nasal com a ajuda de um pincel macio (Fig. 8) em narina contrária à narina utilizada no STT e armazenado num congelador (-80°C) para posterior análise de transportabilidade do muco por meio de

lato fluxo e o ângulo de contato do muco (AC). Para avaliar *in vitro* a transportabilidade do muco, usamos uma máquina que simula tosse ou espirro, adaptado por King *et al.* (King *et al.*, 1985) (Fig. 9).

Figura 8. Coleta do muco nasal com ajuda de um pincel com cerdas macias

Figura 9. Equipamento para análise da transportabilidade por alto fluxo

Um modelo de "traquéia" cilíndrica e de acrílico, com secção transversal de 4 mm e 133 mm de comprimento, é ligado a um tanque de ar pressurizado gerando

um fluxo de cerca de 6 L/s (Nakagawa *et al.*, 2000). Uma amostra de muco (25 ml) foi depositada no tubo de acrílico. A transportabilidade do muco foi medida em milímetros depois de uma única manobra, como a distância de transporte a partir do ponto em que a amostra foi posicionada.

O ângulo de contato é caracterizado pela capacidade do muco se espalhar sobre uma superfície sólida e plana, o qual é formado entre a tangente da interface ar-fluido e a superfície plana (lâmina de vidro). O ângulo de contato também nos dá uma inferência da adesividade, pois a aderência entre o muco e a superfície sólida específica é o reflexo da tensão superficial do muco e do seu ângulo de contato. Para analisar o AC, foi utilizado uma lâmina de vidro tratadas com uma solução sulfocrômica e lavada com água desionizada durante vários tempos. Analisamos o ângulo de contato após cinco minutos da deposição do muco sobre a lâmina de vidro utilizando um programa de análise de imagem (Interactive AxionVision 4.7, Carl Zeiss, Göttinger, Germany) e uma lupa estereoscópica (2000C Stemi, Carl Zeiss, Göttinger, Alemanha) ligado a uma câmara (Axiocam HSC, Carl Zeiss, Göttinger , Alemanha) (Oliveira-Maul *et al.*, 2013; Nicola *et al.*, 2014). (Fig.10)

Foram realizadas três medidas de ângulo para cada amostra, sendo a média o resultado final das medidas.

Figura 10. Equipamentos para análise do ângulo de contato do muco. A: foco de luz multidirecional, B: estereomicroscópio, C: câmera conectada ao estereomicroscópio e ao computador, D: computador com o programa Axiovision de análise de imagem, E: determinação do ângulo por meio de uma reta na superfície da lâmina e outra reta na superfície do muco após cinco minutos de depósito sobre a lâmina (apresentado em Dissertação de Mestrado de Michelle Lisidati Franchini, USP, 2016)

3.2.5 Coleta do lavado nasal

O método foi descrito anteriormente por Naclerio *et al.* (1986) e adaptado por Nicola *et al.* (2014). Os indivíduos foram solicitados a inclinar 30° a cabeça posteriormente e manter apnéia por 10 segundos durante o procedimento. Cinco mililitros de solução isotônica de cloreto de sódio à temperatura ambiente (0,9% de NaCl) foram instilados em cada narina. Após 10 segundos, o indivíduo assoava com força o nariz para um recipiente de plástico estéril. A recuperação média de fluido de LN foi de aproximadamente 70-75%. O LN foi centrifugado (10 min, 300 g, 5°C), e o sobrenadante foi separado do sedimento e dividido em cinco alíquotas de 500 µl. As alíquotas foram identificadas e armazenadas a -80°C durante até 4 semanas para se determinar os valores de citocinas. O “pellet” das células foi utilizado para as contagens de células total e diferencial como anteriormente descrito (Naclerio *et al.*, 1986; Nicola *et al.*, 2014) (Fig. 11).

Figura 11. Coleta de lavado nasal. A: instilação de soro fisiológico 0,5% por meio de uma seringa em uma das narinas e B: coleta do lavado em frasco estéril

3.3 Contagem de células totais e contagem diferencial em LN

Ao “pellet” celular foi adicionado um mililitro de solução tampão fosfato salina (Naclerio *et al.*, 1986; Nicola *et al.*, 2014). Em seguida, 20 μ l dessa amostra foi colocada em uma câmara de Neubauer, e as células foram contadas sob microscopia ótica (400x de aumento) utilizando um microscópio óptico (Olympus CH2, Olympus America Inc., Palo Alto, EUA).

Para contagens de células diferenciais, 100 μ l de amostra foram centrifugadas em cytospin (96 g, 25°C, 6 min) para se obter duas lâminas para as contagens de células diferenciais. As lâminas foram coradas de acordo com o método May-Grunwald-Giemsa e 100 células foram contadas, as células danificadas foram descartadas (Naclerio *et al.*, 1986; Nicola *et al.*, 2014). A porcentagem de células epiteliais (ciliadas e caliciformes), neutrófilos, linfócitos e macrófagos foram calculados como uma fração do total de células. As contagens de células diferenciais foram realizadas com o auxílio de um microscópio de luz 1000x (CH2

Olympus, a Olympus America Inc., Palo Alto, California, EUA) por dois observadores diferentes que desconheciam as condições experimentais (grupos e tempos).

3.4 Quantificação de citocinas e de cotinina do LN

Para determinar os níveis de cotinina no lavado nasal, foi realizado o teste por meio de enzima-imunoensaio de acordo com as instruções do fabricante (DRG International, Inc., EUA). O limite inferior de detecção foi de 0,1 e o ajuste da curva padrão foi entre 0 e 50 ng/ ml (Nicola *et al.*, 2014).

As concentrações de interleucina IL-6 e IL-8 no LN foram determinadas por meio de enzima-imunoensaio (Quantikine HS, R & D Systems Inc., Minneapolis, EUA). O ensaio foi realizado como descrito pelo fabricante. Os limites de detecção de 0,039 pg/ml para IL-6 e 0.11pg/ml para IL-8 com a curva padrão montada entre 0 e 10 pg/ml para IL-6 e 0 e 2000 pg/ml para IL-8.

3.5 Análise Estatística

A análise descritiva das variáveis estão apresentadas em tabelas como valores médios $\pm$ desvio padrão (DP), erro padrão, mediana, quartis 25% e 75% e valores mínimos e máximos.

Utilizamos o software Statistical Package for Social Science (SPSS) versão 23. As variáveis categóricas foram analisadas por meio do teste Qui-quadrado. As variáveis contínuas com distribuição normal foram analisadas ao longo do tempo no grupo cessadores (basal, 1 mês, 3 meses e 12 meses) utilizamos ANOVA para medidas repetidas. Para a análise comparativa entre tabagistas (pré e pós 12 meses) e cessadores (pré e pós 12 meses), utilizamos a two-way ANOVA para

medidas repetidas com análise pos-hoc (ajuste de Bonferroni teste). Consideramos diferenças estatisticamente significativas se $p < 0,05$.

O cálculo amostral de 18 indivíduos para cada grupo foi obtido por meio da variável STT (valor médio normal de 9 minutos com desvio-padrão de 3 minutos), sendo considerada clinicamente significativa, uma diferença de 3 minutos. O poder utilizado foi de 80% e o α de 0,05. (Nakagawa *et al.*, 2005, Oliveira-Maul *et al.*, 2013). Com a possibilidade de perda de 10% da amostra, chegamos a um $n=20$ indivíduos para cada grupo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Nós recrutamos 40 voluntários sendo 20 indivíduos do Programa de Cessação do Tabagismo do Ambulatório de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (grupo de cessadores) e 20 indivíduos na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (grupo tabagistas). Entre os tabagistas, excluímos sete indivíduos que desistiram do estudo após a avaliação basal. As características demográficas (idade, sexo e IMC), a carga tabágica, morbididades, uso de medicações (anti-hipertensivos, diuréticos e beta-bloqueadores), pressão arterial sistólica, frequência cardíaca e oxigenação periférica entre tabagistas e cessadores foram semelhantes (Tabela 1). No entanto, a média da pressão arterial diastólica foi maior em indivíduos do grupo de cessadores em comparação com os tabagistas.

Tabela 1. Dados demográficos e características clínicas de tabagistas e de cessadores no início do estudo. Os valores estão apresentados como média $\pm$ DP ou número de casos e proporção

	Tabagistas n = 13	Cessadores n = 20	Valor de p
Idade , média $\pm$ DP, anos	52 $\pm$ 10	51 $\pm$ 9	0.860
Masculino , n (%)	6 (46)	9 (45)	0.948
IMC , média $\pm$ DP, kg/m ²	25.5 $\pm$ 4.6	28 $\pm$ 6	0.259
Maço-ano , média $\pm$ DP	45 $\pm$ 28	40 $\pm$ 27	0.450
PAS , média $\pm$ DP, anos	116 $\pm$ 13	123 $\pm$ 12	0.926
PAD , média $\pm$ DP, kg/m ²	73 $\pm$ 7	79 $\pm$ 9	0.039
FC , média $\pm$ DP	82 $\pm$ 9	81 $\pm$ 14	0.937
f , média $\pm$ DP	19 $\pm$ 5	18 $\pm$ 4	0.644
Saturação , média $\pm$ DP	94 $\pm$ 3	95 $\pm$ 2	0.351
Morbidade , n (%)			
Hipertensão	2 (15)	9 (45)	0.078
Diabetes	0 (0)	1 (5)	0.413
Depressão	3 (23)	6 (30)	0.663
Infarto do miocárdio	1 (8)	1 (5)	0.751
Arritmia	1 (8)	0 (0)	0.208

Após 12 meses, tabagistas e cessadores apresentaram níveis similares de pressão arterial sistólica (116 ± 17 e 127 ± 13 mmHg, respectivamente), de pressão arterial diastólica (74 ± 13 e 78 ± 9 , respectivamente), de frequência cardíaca (82 ± 17 e 84 ± 9 bpm, respectivamente) e de oxigenação periférica (95 ± 2 e $95 \pm 2\%$, respectivamente) sem diferenças entre o Basal e 12 meses.

No início do estudo (tempo Basal), os dois grupos apresentaram concentrações similares de CO exalado. Um mês depois de cessação do tabagismo, os indivíduos mostraram uma redução significativa nas concentrações de CO exalado quando comparados com tabagistas e essa resposta foi observada até 12 meses (Tabela 2 e Fig.12).

Tabela 2. Análise descritiva dos valores de CO exalado (ppm) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	23,15	20,08	19,47	4,12	3,91	2,62
Desvio padrão	10,96	6,47	13,30	2,20	2,62	1,50
Erro padrão	3,04	1,86	3,05	0,53	0,79	0,53
Mediana	23,00	19,00	17,00	4,00	4,00	3,00
Percentil 25%	13,75	15,50	13,75	2,75	2,00	1,00
Percentil 75%	28,75	25,50	23,00	5,00	5,75	3,50
Mínimo	11,00	11,00	4,00	1,00	1,00	1,00
Máximo	46,00	33,00	63,00	9,00	9,00	5,00

Figura 12. Análise comparativa da concentração de CO exalado entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo

Os valores de STT foram prolongados em ambos os grupos no início do estudo. Após 12 meses, os tabagistas mantiveram o padrão semelhante de prolongamento STT. Por outro lado, os cessadores apresentaram redução significativa nos valores STT (normalização) após um mês até 12 meses (Tabela 3 e Fig.13).

Tabela 3. Análise descritiva dos valores de STT (min) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	17,89	15,15	17,41	10,62	9,42	8,17
Desvio padrão	10,11	8,48	7,71	5,02	2,99	3,12
Erro padrão	2,80	2,35	1,72	1,12	0,72	1,04
Mediana	14,57	15,40	16,45	9,79	9,22	8,09
Percentil 25%	10,04	7,37	13,38	6,82	7,43	6,63
Percentil 75%	25,40	18,97	20,29	12,93	11,25	10,11
Mínimo	5,12	5,18	2,11	5,21	5,38	3,17
Máximo	42,20	31,00	31,15	25,44	17,31	13,47

Figura 13. Análise comparativa dos valores do STT entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo

Os valores de transportabilidade do muco por alto fluxo se mostraram similares entre os grupos tabagistas e cessadores no tempo basal. Após 12 meses de cessação do tabagismo, os indivíduos apresentaram mudanças na transportabilidade do muco, com maior distância percorrida (Tabela 4 e Fig.14).

Tabela 4. Análise descritiva dos valores da transportabilidade do muco por alto fluxo (mm) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	37,25	42,77	47,42	48,30	50,03	58,78
Desvio padrão	14,31	14,91	27,42	27,60	21,63	18,87
Erro padrão	4,13	4,13	6,46	6,33	5,41	6,29
Mediana	37,50	37,00	34,50	41,00	49,00	70,00
Percentil 25%	29,50	32,75	26,00	24,50	34,00	46,50
Percentil 75%	48,00	50,00	70,00	69,72	61,50	73,50
Mínimo	12,00	30,00	8,00	15,00	19,00	28,00
Máximo	60,00	78,00	105,00	97,50	101,50	76,00

Figura 14. Análise comparativa dos valores da transportabilidade do muco por alto fluxo entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo

Os valores do ângulo de contato do muco nasal foram similares nos dois grupos no basal e não se alteraram ao longo de 12 meses (Tabela 5).

Tabela 5. Análise descritiva dos valores do ângulo de contato do muco (°) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	32,90	34,92	36,16	32,73	31,21	32,00
Desvio padrão	6,51	9,63	8,41	6,27	7,45	7,66
Erro padrão	1,88	2,67	1,98	1,40	1,86	2,55
Mediana	32,00	32,00	32,40	31,80	30,75	32,00
Percentil 25%	27,50	28,50	29,80	29,50	25,50	28,87
Percentil 75%	37,50	39,37	42,00	35,00	34,00	37,12
Mínimo	24,20	24,00	26,00	19,70	20,60	17,00
Máximo	45,00	56,00	54,00	51,50	49,80	42,00

As concentrações de cotinina no LN de cessadores diminuíram após 3 meses de cessação do tabagismo e se mantiveram reduzidas até 12 meses (Tabela 6 e Fig.15).

Tabela 6. Análise descritiva dos valores de cotinina (ng/ml) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	45,54	43,58	46,69	34,95	9,17	2,04
Desvio padrão	7,37	14,39	5,02	18,10	17,21	1,50
Erro padrão	2,22	4,34	1,15	4,84	5,19	0,50
Mediana	50,00	50,00	50,00	45,35	2,20	1,80
Percentil 25%	39,05	45,32	43,25	22,60	0,72	0,72
Percentil 75%	50,00	50,00	50,00	50,00	2,95	3,65
Mínimo	31,00	2,00	34,40	0	0	0,20
Máximo	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	4,20

Figura 15. Análise comparativa das concentrações de cotinina em LN entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo

No início do estudo, o número total de células inflamatórias e epiteliais no LN foram semelhantes nos dois grupos (Tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 15). No entanto, os tabagistas apresentaram maior número de macrófagos quando comparado com os

cessadores no basal. Após 12 meses, os cessadores apresentaram um aumento no número de macrófagos no LN ($p < 0,001$), atingindo números semelhantes aos tabagistas (Tabelas 10 e 15).

As concentrações de IL-6 e IL-8 foram similares entre os grupos no início do estudo e após 12 meses. No grupo cessadores não observamos diferença significativa no 1º e 3º mês (Tabelas 13,14 e 15).

Tabela 7. Análise descritiva dos números das células totais em LN de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	74,4	97,1	86,2	35,8	85,1	58,4
Desvio padrão	85,5	60,3	200,3	25,9	87,2	36,6
Erro padrão	25,8	18,2	47,2	7,8	26,3	12,2
Mediana	30	97,0	27,5	31,0	44,0	58,0
Percentil 25%	14,7	47,2	13,0	20,7	28,2	32,7
Percentil 75%	125,5	115,5	77,0	43,2	135,7	76,7
Mínimo	6,0	40,0	2,0	4,0	7,0	13,0
Máximo	257,0	247,0	875,0	91,0	295,0	131,0

Tabela 8. Análise descritiva dos números de neutrófilos em LN de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	24,0	43,6	27,5	27,4	33,0	24,1
Desvio padrão	21,5	36,5	28,2	24,9	28,8	18,5
Erro padrão	8,8	11,5	7,3	7,5	9,1	6,2
Mediana	19,0	30,0	17,0	17,0	32,5	23,5
Percentil 25%	7,0	10,0	1,2	7,7	8,0	9,5
Percentil 75%	48,0	85,0	50,7	46,7	49,0	36,5
Mínimo	1,0	7,0	0	0	2,0	1,0
Máximo	50,0	98,0	83,0	74,0	93,0	53,0

Tabela 9. Análise descritiva dos números de linfócitos em LN de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	8,8	6,5	10,0	11,3	8,7	7,1
Desvio padrão	7,0	7,3	10,2	8,9	5,9	5,1
Erro padrão	2,9	2,3	2,6	2,7	1,9	1,8
Mediana	6,5	4,5	5,0	11,0	9,5	6,5
Percentil 25%	4,0	1,0	2,2	5,0	4,0	2,5
Percentil 75%	17,0	11,0	18,2	15,0	13,0	12,0
Mínimo	1,0	0	0	0	0	1,0
Máximo	18,0	23,0	30,0	32,0	17,0	14,0

Tabela 10. Análise descritiva dos números de macrófagos de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	32,8	27,4	15,2	18,7	17,3	44,2
Desvio padrão	14,3	20,1	10,6	14,3	11,5	14,9
Erro padrão	5,8	6,4	2,7	4,3	3,6	5,3
Mediana	36,0	28,5	15,0	16,0	14,0	46,0
Percentil 25%	27,0	9,0	5,7	6,2	9,0	34,5
Percentil 75%	40,0	39,0	22,5	27,5	31,0	52,0
Mínimo	8,0	0	1,0	2,0	4,0	21,0
Máximo	50,0	61,0	34,0	44,0	34,0	68,0

Tabela 11. Análise descritiva dos números de células ciliadas de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	34,2	21,1	23,7	37,4	21,7	21,1
Desvio padrão	15,5	16,6	25,1	22,5	22,2	5,4
Erro padrão	6,3	5,2	4,5	6,8	7,0	1,9
Mediana	28,5	20,0	12,0	40,0	12,5	22,5
Percentil 25%	24,0	6,0	4,2	15,2	5,0	17,0
Percentil 75%	49,0	35,0	45,0	55,7	25,0	25,0
Mínimo	18,0	0	1,0	6,0	3,0	12,0
Máximo	57,0	46,0	71,0	71,0	64,0	28,0

Tabela 12. Análise descritiva dos números de células caliciformes de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	2,3	1,2	10,1	6,4	10,4	3,1
Desvio padrão	2,6	2,9	14,2	8,9	7,8	3,0
Erro padrão	1,0	0,9	3,7	2,7	2,5	1,1
Mediana	2,0	0	4,0	3,0	12,0	2,5
Percentil 25%	0	0	0	0,7	1,00	0,5
Percentil 75%	5,0	0	14,5	7,0	17,0	5,5
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	5,0	9,0	50,0	27,0	21,0	8,0

Tabela 13. Análise descritiva das concentrações de IL-6 (pg/ml) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	2,7	3,9	2,3	3,0	2,0	2,3
Desvio padrão	3,7	4,3	3,2	3,1	2,5	1,9
Erro padrão	1,1	1,3	0,7	0,9	0,7	0,7
Mediana	1,2	1,3	0,6	2,5	1,3	2,1
Percentil 25%	0,5	1,1	0,3	0,3	0,4	0,9
Percentil 75%	2,2	8,7	2,9	4,2	2,5	3,1
Mínimo	0,4	0,5	0	0	0	0,4
Máximo	10,5	10,5	10,5	10,5	9,1	6,1

Tabela 14. Análise descritiva das concentrações de IL-8 (pg/ml) de tabagistas e de cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n=13		Cessadores n=20			
	Basal	12 meses	Basal	1 mês	3 meses	12 meses
Média	584,4	770,4	415,6	308,2	352,9	472,4
Desvio padrão	628,9	518,7	589,3	395,4	275,6	398,5
Erro padrão	189,6	156,4	147,3	106,9	83,1	132,8
Mediana	350,6	623,4	181,4	168,3	234,9	369,6
Percentil 25%	189,4	513,7	111,3	96,0	116,2	112,5
Percentil 75%	932,3	857,5	438,5	361,5	586,9	687,6
Mínimo	0	130,4	0	0	69,9	26,8
Máximo	2098,4	2098,4	2183,6	1334,7	764,8	1227,3

Tabela 15. Análise comparativa do número total de células inflamatórias e células epiteliais e concentrações de citocinas no LN entre tabagistas e cessadores ao longo do estudo

	Tabagistas n = 13		Cessadores n = 20			
	Basal	12 ^o mês	Basal	1 ^o mês	3 ^o mês	12 ^o mês
Células totais (x10⁶)						
Neutrófilo	74 (85)	97 (60)	86 (200)	36 (26)	85 (87)	58 (37)
Linfócito	24 (21)	44 (37)	27 (28)	27 (25)	33 (29)	24 (18)
Macrófago	9 (7)	7 (7)	10 (10)	11 (9)	9 (6)	7 (5)
Ciliadas	33 (14)	27 (20)	15 (11)*	19 (14)	17 (11)	44 (15)*
Caliciformes	34 (15)	21 (17)	21 (25)	37 (23)	22 (22)	21 (5)
	2 (3)	1 (3)	10 (14)	6 (9)	10 (8)	3 (3)
Citocina (pg/ml)						
Interleucina-6	2.7 (3.7)	3.9 (4.3)	2.3 (3.2)	3.1 (3.1)	2.0 (2.5)	2.3 (2.0)
Interleucina-8	584.4 (628.9)	770.4 (518.7)	415.7 (589.3)	308.2 (385.4)	352.9 (275.6)	472.4 (398.5)

Abreviações: * p<0.001 vs início, * p=0.006 vs outro grupo no mesmo período

5. DISCUSSÃO

O presente estudo longitudinal de 12 meses de acompanhamento mostra que indivíduos com idade média de 52 anos (30-64 anos) tabagistas com carga tabágica média de 45 maços-ano (7-96 maços-ano) possuem disfunção do TMC nasal combinado com o muco nasal com menor transportabilidade por alto fluxo e presença de inflamação nasal observada por aumento do número de macrófagos e da concentração de citocinas. A cessação do tabagismo induziu restauração do TMC nasal em 63%, 76% e 85% dos indivíduos respectivamente após 1 mês, 3 meses e 12 meses. Após 12 meses de cessação, a melhora do TMC nasal foi combinada com alteração das propriedades do muco (aumento em 35% da transportabilidade do muco por alto fluxo). Apesar dessa melhora funcional do TMC, esse estudo também mostra persistência ou piora da resposta inflamatória local (aumento do número de macrófagos) aos 12 meses de cessação do tabagismo.

O TMC é um mecanismo de defesa do sistema respiratório e ele pode ser avaliado pelo STT, que é um teste não invasivo, simples e de baixo custo. O STT é um método que pode ser afetado por fatores intrínsecos em indivíduos saudáveis, como por exemplo, o ciclo circadiano e o envelhecimento. Do nosso grupo de pesquisa, Nakagawa *et al.* (2010) mostraram que o STT é um método reprodutível quando realizado em um mesmo período do dia (manhã, tarde e noite). Oliveira-Maul *et al.* (2013) determinaram o valor normal de STT de ≤ 12 minutos em uma amostra de 79 indivíduos saudáveis de diversas faixas etárias. Os pesquisadores também demonstraram um aumento no valor de STT em indivíduos saudáveis é de 2% a cada ano de vida, a partir dos 18 anos. Esse efeito deletério do

envelhecimento sobre um mecanismo de defesa do sistema inato respiratório (disfunção do TMC) pode estar associado à redução da frequência do batimento ciliar (Agius *et al.*, 1998). Essa e outras mudanças no sistema respiratório associadas com o envelhecimento (Meyer, 2004; Antonini *et al.*, 2001) como redução da elasticidade da matriz extracelular pulmonar (Britto *et al.*, 2009), perda da força muscular diafragmática e declínio da função pulmonar (Enright *et al.*, 1993) podem aumentar a susceptibilidade do indivíduo às infecções respiratórias (Konrad *et al.*, 1994). Na literatura (Tabela 16), estudos com indivíduos tabagistas com idade superior a 33 anos mostram prolongamento do TMC nasal com variação entre 35 e 120% (Stanley *et al.*, 1986; Alfaro-Monge e Soda-Merhy, 1995; Nakagawa *et al.*, 2005; Karaman e Tek, 2009; Ramos *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2015), chegando a cerca de 400% de aumento do STT, particularmente em tabagistas com maior carga tabágica (Habesoglu *et al.*, 2012). Porém, a maioria dos estudos não descreveu a presença ou ausência de morbidades como diabetes e hipertensão que são frequentes em idosos. Oliveira-Maul *et al.* (2013) estudaram 173 indivíduos com diabetes e/ou hipertensão arterial e 79 saudáveis. Eles observaram um efeito deletério de 2,64x de prolongamento do STT associados com as doenças. No presente estudo, apenas dois indivíduos tinham hipertensão e nenhum tinha diabetes entre os tabagistas (n=13) e, entre os cessadores (n=20), apenas um indivíduo tinha diabetes e nove tinham hipertensão. Nosso presente estudo confirma dados da literatura de que tabagistas possuem disfunção do TMC, aproximadamente 76% dos tabagistas apresentaram STT prolongado (~30%).

Tabela 16. Revisão da média dos valores do teste de trânsito da sacarina em indivíduos tabagistas e não tabagistas

Autores	N sujeitos	Idade	Hábito de fumar (maço-ano)	STT (min)
Stanley <i>et al.</i> 1986	Total n=27	33	Não tabagistas	11,1 ± 3,8
			Tabagistas	20,8 ± 9,3*
Alfaro-Monge e Soda-Merhy, 1995	Total n=100		Não tabagistas	10,3
			Tabagistas	13,6*
Nakagawa <i>et al.</i> 2005	Total n=16	32 ± 14	Não tabagistas	10,5
			Tabagistas	22,0*
Karaman e Tek 2009	Não tabagistas n=20	18-57	Não tabagistas	12,1 ± 1,9
	Tabagistas n=20		Tabagistas > 1	26,4 ± 1,8*
Piotrowska <i>et al.</i> 2010	Não tabagistas n=21	59 ± 9	Não tabagistas	9,9 ± 0,5
	DPOC n=42	50-84	Tabagistas DPOC: 35.8 ± 13.7	16,3 ± 1,6¥
			Cessadores DPOC	11,2 ± 0,5
Ramos <i>et al.</i> 2011	Não tabagistas n=33	52 ± 14	Não tabagistas	8,0 (7-13)
	Tabagistas n=33	49 ± 12	Tabagistas: 44 ± 25	13,0 (8-25)*
Ito <i>et al.</i> 2015	Não tabagistas n=26	60 ± 11	Não tabagistas	8,0 (6-16)
	Tabagistas n=27	62 ± 8	Tabagistas: 38.8 ± 27.6	15,9 (10-27)*
	Cessadores DPOC n=23	58 ± 8	Cessadores DPOC: 31.5 ± 24.8	9,7 (6-12)
	Tabagistas DPOC n=17	61 ± 6	Tabagistas DPOC: 39.9 ± 21.4	16,5 (11-28)§
Littlejohn <i>et al.</i> 1992	Total n=10	> 18	Tabagistas	11,7 ± 3,3
Mahakit e Pumhirun, 1995	n=40		Não tabagistas	12,0
	n=19		Tabagistas > 5 maços-ano	16,5 ± 5,0
Proença <i>et al.</i> 2012	Não tabagistas n=30	49 (44-5)	Não tabagistas	8,0 (8-11)
	Tabagistas n=52	50 (43-50)	Tabagistas: 62 (36-78)	10,0 (10-13)
	Leve n=17	51 (41-54)	Leve: 23 (23-36)	9,0 (7-11)
	Moderado n=22	47 (38-49)	Moderado: 15 (13-23)	13,0 (11-17)
	Heavy n=13	50 (41-57)	Heavy: 25 (19-30)	13,0 (10-21)
Habesoglu <i>et al.</i> 2012	Não tabagistas n=15	28 ± 11	Não tabagistas	6,4 ± 1,6
	Tabagistas Passivo n=15	29 ± 12	Tabagistas Passivo:	12,6 ± 4,7*
			< 10 cigarros/dia	9,3 ± 4,7
			> 10 cigarros/dia	15,5 ± 2,0
	Tabagistas Ativo n=17	28 ± 11	Tabagistas Ativo	23,6 ± 12,4*
			< 10 cigarros/dia	11,0 ± 3,5
			10-20 cigarros/dia	24,3 ± 3,0
			> 20 cigarros/dia	35,0 ± 14,9
Nicola <i>et al.</i> 2014	Não tabagistas n=32	21 ± 4		7,7 ± 4,1
	Tabagistas n=40	19 ± 1	Tabagistas Saudável: < 2,5	5,7 ± 3,4*
		24 ± 5	Tabagistas Saudável: > 2,5	5,9 ± 2,9*
Pagliuca <i>et al.</i> 2015	Não tabagistas n=30	53 ± 6		11,7
	Cessadores n=30	51 ± 7	Cessadores: 25 ± 8 cigarros/dia	11,8
	Tabagistas n=3	52 ± 6	Tabagistas: 25 ± 6 cigarros/dia	15,6
Utiyama <i>et al.</i> , 2016	Cessadores n=20	51 ± 9	Cessadores: 40 ± 27	8,2 ± 3,1
	Tabagistas n=13	52 ± 10	Tabagistas: 45 ± 28	17,9 ± 10,1*

Abreviaturas: * p < 0,05 versus não tabagistas; ¥ p < 0,05 versus outros grupos; § p < 0,05 versus cessadores

A cessação do tabagismo é o tratamento mais indicado para a redução dos sintomas respiratórios, a melhora da função pulmonar e redução da hiperresponsividade de vias aéreas (Kanner *et al.*, 1999; Wise *et al.*, 2003; Willemse *et al.*, 2004). Quanto à restauração da função do TMC, Ramos *et al.* (2011) observaram que apenas 15 dias de cessação do tabagismo melhora o STT em 60% em indivíduos adultos com idade média de 49 anos. Outros estudos com indivíduos com DPOC também relatam normalização dos valores de STT acompanhada de redução de sintomas respiratórios (Piotrowska *et al.*, 2010) e nasais (Ito *et al.*, 2015). Nossos resultados corroboram outros estudos da literatura que avaliaram os efeitos da cessação do tabagismo sobre o TMC. Os indivíduos cessadores apresentaram melhora de 63% no STT a partir do primeiro mês de cessação do tabagismo, sendo que aos 12 meses de cessação, 85% dos indivíduos apresentaram valores similares de STT a indivíduos saudáveis não tabagistas de mesma faixa de idade relatado em literatura (Oliveira-Maul *et al.*, 2013).

No nosso estudo não mensuramos a quantidade e a composição do muco nasal para verificar os efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo. Porém, analisamos as propriedades do muco (um dos principais componentes do TMC) por meio da transportabilidade por alto fluxo e do ângulo de contato. O aumento de produção do muco e alterações das propriedades físicas com redução do TMC podem ser características de doenças respiratórias (ver revisão de Ramos *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2015; Prescott *et al.*, 1995) e do tabagismo (Prescott *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 2011). No tabagismo, as alterações das propriedades do muco podem estar associadas com alterações do transporte de membrana de íons e de água no epitélio respiratório. Estudos com cultura de células demonstraram que a

fumaça do cigarro altera o transporte de membrana de íons e de água por meio do bloqueio de canais *Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor* (Moran *et al.*, 2014 em cultura de oócitos de *Xenopus laevis*), com redução da secreção de Cl^- , do volume do fluido periciliar (hidratação) (Virgin *et al.*, 2010 em cultura de células epiteliais do nariz de humanos) e do TMC. Além disso, evidências mostram que a fumaça do cigarro e outros produtos podem resultar em produção anormal (aumentada) de mucinas nas vias aéreas via estresse oxidativo e inflamação (Takeyama *et al.*, 2001). Estudos prévios do nosso laboratório mostram valores médios de transportabilidade do muco nasal por alto fluxo em jovens saudáveis de aproximadamente 34 ± 9 mm (Goto *et al.*, 2010) e de ângulo de contato de aproximadamente $38 \pm 4^\circ$ (Goto *et al.*, 2010; Nicola *et al.*, 2014) e em tabagistas jovens, a média de ângulo de contato foi de $40 \pm 9^\circ$ (Nicola *et al.*, 2014). No presente estudo, os tabagistas (idade média de 52 anos) apresentaram valores médios de transportabilidade do muco por alto fluxo de 43 ± 20 mm e de ângulo de contato de $35 \pm 7^\circ$. Ao longo do estudo, não observamos mudanças no ângulo de contato em ambos grupos, tabagistas e cessadores. Essa resposta é consistente com estudos prévios (Nicola *et al.*, 2014). Com a cessação do tabagismo, esperávamos observar com a cessação da exposição do epitélio respiratório ao estímulo agressor (fumaça e outros produtos do cigarro) restauração do transporte iônico e de água na membrana apical e basolateral, hidratação e consequente alteração das propriedades do muco (Clunes *et al.*, 2012) em paralelo com a melhora do TMC. Porém, somente após 12 meses de cessação observamos um aumento da transportabilidade do muco por meio de alto fluxo (~23%) sem alteração do ângulo de contato. Esse resultado está alinhado com estudos prévios que mostram que as

propriedades do muco de transportabilidade por tosse são menos eficientes em tabagistas que não tabagistas ou cessadores (Rubin *et al.*, 1992). Acreditamos que essa melhora tardia da transportabilidade do muco por alto fluxo esteja associada a alguns fatores, entre eles, à redução do estresse oxidativo e à regeneração do epitélio ciliado e da espessura. Dessa forma, a melhora do TMC nasal pode ser associada à normalização da estrutura ciliar e ciliogênese (Tamashiro *et al.*, 2009; Aufderheide *et al.*, 2015). Mas a análise da estrutura dos cílios e/ou mensuração da frequência do batimento ciliar esteve fora do escopo do nosso estudo pois essas análises exigiriam uma coleta por escovação ou biópsia nasal, sendo ambos métodos invasivos.

O epitélio do trato respiratório apresenta um papel fundamental na regulação das respostas inflamatórias em diversas condições ambientais e clínicas (Tanni *et al.*, 2010; Celik *et al.*, 2015). A inalação de fumaça e outros produtos do cigarro de forma crônica e dependente da história acumulativa de tabagismo induz inflamação de trato respiratório superior e inferior por meio de vários mecanismos que incluem: o recrutamento e o aumento do número de células inflamatórias (Karimi *et al.*, 2012), aumento da liberação de mediadores inflamatórios (Floreani e Rennard, 1999) e alteração de tipos celulares e função, como aumento do número de células caliciformes e aumento da espessura do epitélio respiratório (Hadar *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* e em animais mostram que a inflamação de vias aéreas pode ser amplificada particularmente em indivíduos que possuem doenças respiratórias, como a asma por exemplo (revisão de Floreani e Rennard, 1999) observada por meio do aumento do estresse oxidativo e da inflamação neurogênica. Nossos resultados mostram inflamação nasal especificamente pelo aumento de número de

células inflamatórias e concentrações elevadas de citocinas (IL-6 e IL-8) em LN de tabagistas em comparação com dados de saudáveis da literatura (Goto *et al.*, 2011; Nicola *et al.*, 2014).

Achado interessante do presente estudo foi encontrarmos, após 12 meses de cessação, um número aumentado de macrófagos (2x basal) combinado com as concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, similares ao basal. Estudos anteriores mostram possíveis mecanismos que podem estar associados com essa resposta inflamatória crônica em cessadores do tabagismo. Em um período médio de cessação até 42 meses, Laperre *et al.* (2006) descreveram manutenção de inflamação brônquica em indivíduos com DPOC por meio de aumento de células citotóxicas ativadas considerando possível associação com colonização crônica das vias aéreas por patógenos virais ou bacterianos e com a apoptose das células epiteliais das vias aéreas. Gamble *et al.* (2007) não observaram alterações em marcadores inflamatórios de biópsias brônquicas de indivíduos com DPOC após a cessação do tabagismo. Devemos ressaltar que em nosso estudo não realizamos provas de função pulmonar ou outras análises laboratoriais para identificar presença de DPOC ou de outras doenças respiratórias. Porém, em estudo de Swan *et al.* (1992) onde os resultados de 12 meses de cessação foram ajustados para idade, maços-ano e função pulmonar, mostrou redução do número de macrófagos e neutrófilos combinado com redução da metaplasia de células caliciformes e da quantidade de muco nas vias aéreas. Dessa forma, os nossos resultados de melhora do TMC combinada com o aumento da transportabilidade por alto fluxo e persistência da inflamação nasal após a cessação do tabagismo observados após 12 meses podem, juntos, sugerir presença de doença respiratória não

diagnosticada.

Esse estudo tem outras limitações. Primeiramente o tamanho amostral de tabagistas foi pequeno e não pareado com o grupo de cessadores. De fato, nós começamos com 20 indivíduos em cada grupo a partir do cálculo amostral. No entanto, sete tabagistas retiraram o consentimento depois da avaliação basal e foram excluídos da análise. Outra limitação foi o número de indivíduos cessadores do Programa de Cessação do tabagismo que efetivamente pararam de fumar ter sido superestimado porque a forma de análise primária foi de relato da condição (ainda tabagista ou cessador). No entanto, outros dois métodos foram utilizados para comprovar a condição de tabagista ou de cessação por meio da quantificação de CO exalado (avaliação de últimas 2-4 horas) e de cotinina no LN (avaliação de últimas 12-16 horas) ao longo do estudo. Com o uso do CO exalado, com apenas 1 mês observou-se redução dos valores a níveis de não tabagismo (< 10 ppm). Por outro lado, a cotinina em LN somente confirmou a cessação do tabagismo aos 3 meses do estudo. Esses resultados podem estar associados com a terapia de reposição de nicotina, como parte dos medicamentos usados pelos cessadores durante o programa de cessação. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de indivíduos terem aderido ao programa de cessação lentamente ou completamente somente aos 3 meses. Outra limitação desse estudo foi a contagem de células de lavado nasal por método histológico bidimensional que não leva em consideração o volume da célula. No entanto, o método histológico permitiu a análise quantitativa do padrão inflamatório com determinação do perfil de células epiteliais e inflamatórias dos indivíduos tabagistas e cessadores.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- 1) Indivíduos tabagistas com idade média de 52 anos e carga tabágica média de 43 maços-ano apresentam prolongamento do TMC nasal, possuem um muco com transportabilidade reduzida por alto fluxo e inflamação nasal;
- 2) Após um mês de cessação do tabagismo observa-se restauração dos valores de TMC nasal dentro de padrões da normalidade; e
- 3) Após 12 meses de cessação do tabagismo a restauração do TMC nasal a valores normais é acompanhada de aumento da transportabilidade do muco por alto fluxo. Porém, a inflamação nasal se mantém com concentrações elevadas de citocinas IL-6 e IL-8 e aumento do número de macrófagos.

7. ANEXOS

ANEXO A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- FMUSP

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **06/08/2014**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **235/14** intitulado: **“EFEITOS DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO TABAGISMO SOBRE OS MECANISMOS DE DEFESA DAS VIAS AÉREAS E EXPRESSÃO GÊNICA DE MICRORNAS EM SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS”** apresentado pelo **Departamento de FISIOTERAPIA, FONOAUDIOLOGIA E TERAPIA OCUPACIONAL**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12).

Pesquisador (a) Responsável: Naomi Kondo Nakagawa

Pesquisador (a) Executante: Daniela Mitiyo Odagiri Utiyama

O pesquisador deverá aguardar a aprovação da CONEP para iniciar a pesquisa.

CEP-FMUSP, 06 de Agosto de 2014.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:
 TELEFONE: DDD (.....)
 2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE: CEP: ...
 TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **EFEITOS DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO TABAGISMO SOBRE OS MECANISMOS DE DEFESA DAS VIAS AÉREAS E EXPRESSÃO GÊNICA DE MICRORNAS EM SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS**
2. PESQUISADORES: FT. Daniela Mitiyo Odagiri Utiyama e DRA. Naomi Kondo Nakagawa.
 CARGO/FUNÇÃO: FISIOTERAPEUTA E PROFESSORA DE FISIOTERAPIA (respectivamente)
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CREFITO 98139-F e CREFITO 5076-F
 UNIDADE DO HCFMUSP: LABORATÓRIO DE POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA EXPERIMENTAL FMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : abril de 2014 a abril 2016.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – O presente projeto avaliará: (a) o transporte mucociliar por meio do teste de sacarina, (b) as propriedades físicas do muco nasal por meio de ângulo de contato e transportabilidade por tosse, (c) pH, celularidade total e diferencial, citocinas e proteômica em lavado nasal e (d) o pH em condensado do ar exalado (e) função pulmonar por espirometria e (f) análise de microRNAs em sangue periférico em pacientes tabagistas e ex-tabagistas.

2 – Se o(a) Sr(a). concordar em participar do estudo, faremos uma avaliação com aplicação de questionários sobre seus dados pessoais, que demora em torno de 15 minutos, e um questionário de sintomas nasais, seguidos de exame físico para medida de pressão arterial, oxigenação periférica, temperatura corporal, frequência respiratória e frequência cardíaca. Em seguida, verificaremos qual a narina desobstruída para o teste da sacarina. Colocaremos 5 grãos de sacarina no nariz e marcaremos com cronômetro o tempo que Sr(a). referir sentir o gosto do adoçante na garganta. Em seguida, coletaremos o muco nasal com ajuda de um pincel. Depois faremos o teste do lavado nasal onde colocaremos 5 ml de soro fisiológico por meio de uma seringa no seu nariz e o(a) Sr(a). ficará 10 segundos sem respirar e devolver em um pote o soro fisiológico do seu nariz. Para a coleta do condensado do ar exalado o Sr(a). respirará pela boca durante um período de 10 a 15 minutos, conectado a um aparelho por um bocal descartável. Também coletaremos 6 ml de sangue periférico. Esses exames serão realizados em 3 avaliações: no começo do estudo, 6 meses de acompanhamento e 12 meses de acompanhamento.

3 – Não há qualquer obrigatoriedade da sua participação neste estudo. Da mesma forma, a qualquer momento o(a) Sr(a). poderá deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo ao Sr(a). Os riscos do estudo são mínimos porque essas avaliações já foram utilizadas em crianças, jovens, idosos e inclusive em pacientes gravemente enfermos. De qualquer forma, o(a) sr(a) contará com a ajuda para quaisquer esclarecimentos por parte da equipe de saúde que acompanhará todo o estudo.

4 – Os grãos de sacarina colocados no nariz podem causar leve sensação de doce no final do teste ou vontade de espirrar no início. A coleta do muco do nariz pode fazer o Sr(a). sentir uma leve coceira no nariz. No teste do lavado nasal, o(a) Sr(a). poderá sentir pequeno desconforto de ficar sem respirar por 10 segundos. Para a coleta do condensado do ar exalado precisará segurar o equipamento de peso menor que 0,5 Kg com uma mão durante o período de 10-15 minutos. Na coleta de sangue periférico que será realizada por pessoal especializado, poderá ficar um pequeno hematoma ou dor na região da coleta.

5- Não há benefício direto para o(a) Sr(a). Mas os resultados desse estudo poderão contribuir no entendimento dos efeitos do hábito de fumar e da cessação do tabagismo sobre o sistema respiratório do corpo.

6 – O(a) Sr(a). tem garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são a Dra. Daniela Mitiyo Odagiri Utiyama e a Dra Naomi Kondo Nakagawa, que podem ser encontradas no Laboratório de Defesa Pulmonar. Av. Dr. Arnaldo, 455 - 1º andar, sala 1150; Telefone: 11 30618529 (Dra. Naomi) e 11 974260066 (Dra. Daniela) E-mail: danielautiyama@usp.br. Se o(a) Sr(a). tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br e Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde - (CEP/SMS)- Rua General Jardim, 36 1º andar Tel: 3397-2464 / Fax: 33972465 ou E-mail: smscep@gmail.com.

7. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

8. Direito de confidencialidade – As informações do(a) sr(a) serão analisadas em conjunto com outros pacientes, e não será divulgada a sua identidade;

9. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11. Caso haja dano associado ou decorrente da pesquisa – agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou à coletividade, decorrente da pesquisa o(a) sr(a) poderá solicitar indenização - cobertura material para reparação a dano, causado pela pesquisa.

12. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **EFEITOS DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO TABAGISMO SOBRE OS MECANISMOS DE DEFESA DAS VIAS AÉREAS E EXPRESSÃO GÊNICA DE MICRORNAs EM SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS**. Eu discuti com a Dra. Daniela Mitiyo Odagiri Utiyama sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros 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 e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. **Também autorizo além da coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do muco nasal, do lavado do nariz e do sangue referentes a esse projeto de pesquisa específico.**

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO C. Ficha de anamnese dos indivíduos

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome: _____ identificação: _____
 Data de nascimento: _____ Idade: _____ Altura: _____ Peso: _____ Estado civil: _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____ Estado: _____
 Telefone: _____ Celular: _____ Grau de escolaridade: _____
 Profissão: _____ Moradia: _____ Animais: _____
 HAS () não () sim medicamento: _____
 DM () não () sim medicamento: _____
 DPOC () não () sim medicamento: _____
 outros () não () sim medicamento: _____
 Internações hospitalares prévias: _____
 Infecção respiratória: () não () sim quando: _____
 Fagerstrom: _____ Quantos cigarros/dia: _____ Há quanto tempo: _____
 Realiza atividade física: () não () sim quantas vezes na semana: _____

Parâmetros	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4
Data e hora				
Narina ()				
STT - crômetro				
FC				
PA				
T				
Sat O2				
Freq. Resp				
COex				
COHb				
Temp amb				
Umidade ar				
pH LN				
pH EBC				
Tosse				
Angulo				
Cel totais				
Neutrófilos				
Linfócitos				
Eosinófilos				
Macrófagos				
Ciliadas				
Caliciformes				

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agius AM, Smallman LA, Pahor AL. Age, smoking and nasal ciliary beat frequency. *Clin Otolaryngol*. 1998;23:227-230.
2. Alfaro-Monge JM, Soda-Merhy A. The comparative test of nasal mucociliary function in healthy subjects, smokers and non-smokers. *Acta Otolryngol Esp*. 1995;46(3):187-189.
3. Amatngalim GD, Brokeman W, Daniel NM, van der Vlugt LEPM, van Schadewijk A, Taube C, Hiemstra PS. Cigarette smoke modulates repair and innate immunity following injury to airway epithelial cells. *Plos One*. 2016; 11(11):e0166255.
4. Anderson WH, Coakley RD, Button B, Henderson AG, Zeman KL, Alexis NE, Peden DB, Lazarowski ER, Davis CW, Bailey S, Fuller F, Almond M, Qaqish B, Bordonali E, Rubinstein M, Bennet WD, Kesimer M, Boucher RC. The relationship of mucus concentration (hydration) to mucus osmotic pressure and transport in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(2):182-190.
5. Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial. *Ann Intern Med*. 2005;142(4):233-239.
6. Anotini JM, Roberts JR, Clarke RW, Yang HM, Barger MW, Ma JYC, Weissman DN. Effects of age on respiratory defense mechanisms: pulmonary bacterial clearance in fischer rats after intratracheal instillation of listeria monocytogenes. *Chest*. 2001;120(1):240-249.
7. Aufderheide M, Scheffler S, Ito S, Ishikawa S, Emura M. Ciliotoxicity in human

- primary bronchiolar epithelial cells after repeated exposure at the air-liquid interface with native mainstream smoke of K3R3F cigarettes with and without charcoal filter. *Exp Toxicol Pathol*. 2015;67:407-411.
8. Benowitz, N.L. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Eng J Med*. 1988;319:1318-1330.
 9. Boeira, S. L.; Guivant, J. S. Indústria de tabaco, tabagismo e meio ambiente: as redes ante os riscos. *Cad Cie Tecnol* (Embrapa). 2003; 20(1):45-78.
 10. Britto RR, Zampa CC, de Oliveira TA, Prado LF, Parreira VF. Effects of aging process on respiratory function. *Gerontology*. 2009;55(5):505-510.
 11. Button B, Boucher RC. Role of mechanical stress in regulating airway surface hydration and mucus clearance rates. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008;163(1-3): 189–201.
 12. Celik H, Akpinar S, Karabulut H, Oktar P, Dursun B, Erguden HC, Gunay S, Sipit T. Evalution of IL-8 nasal lavage levels and the effects of nasal involvement on disease severity in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*. 2015;38(2):616-622.
 13. Celli BR. Update on the management of COPD. *Chest*. 2008;133:1451-1462.
 14. Chaudhuri R, Livingston E, McMahon AD, Lafferty J, Fraser I, Spears M, McSharry CP, Thomson NC. Effects of smoking cessation on lung function and airway inflammation in smokers with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:127-133.
 15. Clunes LA, Davies CM, Coakley RD, Aleksandrov AA, Henderson AG, Zeman KL, Worthigton EN, Gentzsch M, Kreda SM, Cholon D, Bennet WD, Riordan JR, Boucher RC, Tarran R. Cigarette smoke exposure induces CFTR

internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration.

The FASEB J. 2012;26(2):533-545.

16. Cosio MG, Hale KA, Niewoehner DE. Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways. *Am Rev Respir Dis.* 1980;122(2):265-321.
17. Decramer M, Nici L, Nardini S, Reardon J, Rohester CL, Sanguinetti CM, Troosters T. Targeting the COPD exacerbation. *Respir Med.* 2008;102(1):S3-15.
18. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung: preliminar reposrt. *Br Med J.* 1950;2(4682):739-748.
19. Doll R, Peto R, Boreham J. Mortality in relation to smoking: 50 years observations on male British doctors. *Brit Med J.* 2004;328:1519-1533.
20. Enright PL, Kronmal RA, Higgins M, Schenker M, Haponik EF. Spirometry reference values for women and men 65 to 85 years of age. Cardiovascular healthy study. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(1):125-133.
21. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* 2010; 363(23):2233-2247.
22. Fiore MC, Jáen CR, Baker TB, Bailey W, Benowitz N, Curry S. Treating tobacco use and dependence: 2008 Update. Clinical Practice Guideline. Rockville, MD: Public Health Service, 2008.
23. Floreani AA, Rennard SI. The role of cigarette smoke in the pathogenesis of asthma as a trigger for acute symptoms. *Curr Opin Pulm Med.* 1999; 5: 38-46.
24. Franchini, ML. Efeitos do oxigênio umidificado e não umidificado via cateter nasal sobre o transporte mucociliar e muco nasal [dissertação] São Paulo:

Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

25. Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, O'Shaughnessy T, Ram FSF, Qiu Y, Zhu J, Vignola AM, Kroegel C, Morell F, Pavord ID, Rabe KF, Jefferrey PK, Barnes NC. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J*. 2007;30:467-471.
26. Goto DM, Torres GM, Seguro AC, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G, Nakagawa NK. Furosemide impairs nasal mucociliary clearance in humans. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;170(3):246-252.
27. Goto, DM, Lança M, Obuti CA, Galvão Barbosa CM, Nascimento Saldiva PH, Trevisan Zanetta DM, Lorenzi-Filho G, de Paula Santos U, Nakagawa NK. Effects of biomass burning on nasal mucociliary clearance and mucus properties after sugarcane harvesting. *Environ Res*. 2011 Jul;111(5):664-669.
28. Guyton AC, Hall JE. Resistência do corpo à infecção: leucócitos, granulócitos, sistema monocítico-macrofágico e inflamação. In: Tratado de Fisiologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.p.429-438.
29. Habesoglu M, Demir K, Yumusakhuyli AC, Yilmaz AS, Oysu C. Does passive smoking have an effect on nasal mucociliary clearance? *Otolaryngology Head Neck Surg*. 2012;147(1):152-156.
30. Hadar T, Yaniv E, Shvili Y, Koren R, Shvero J. Histopathological changes of the nasal mucosa induced by smoking. *Inhal Toxicol*. 2009;21(13):1119-1122.
31. Halvorsen B, Sagen EL, Ueland T, Aukrust P, Tonstad S. Effect of smoking cessation on markers of inflammation and endothelial cell activation among individuals with high risk for cardiovascular disease. *Scan J Clin Lab Invest*.

2007;67:604-611.

32. Hortense FTP, Carmagnani MIS, Brêtas ACP. O significado do tabagismo no contexto do câncer de laringe. *Rev Bras Enferm.* 2008;61(1):24-30.
33. Ito JT, Ramos D, Lima FF, Rodrigues FM, Gomes PR, Moreira GL, Macchione M, Toledo AC, Ramos MCE. Nasal mucociliary clearance in subjects with COPD after smoking cessation. *Respir Care.* 2015;60(3):399-405.
34. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Imunobiologia o sistema imune na saúde e na doença*. 5. ed. São Paulo. Artemed. 2002.
35. Junqueira LC, Carneiro J. Aparelho respiratório. In: *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.p.339-358.
36. Kanner RE, Connett JE, Williams DE, Buist AS. Effects of randomized assignment to a smoking cessation intervention and changes in smoking habits on respiratory symptoms in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease:the lung health study. *Am J Med.* 1999;106(4):410-416.
37. Karaman M, Tek A. Deleterious effect of smoking and nasal septal deviation on mucociliary clearance and improvement after septoplasty. *Am J Rhinol Allergy.* 2009;23(1):2-7.
38. Karimi R, Tornling G, Grunewald J, Eklund A, Skold CM. Cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid in smokers is dependente on cumulative smoking history. *Plos One.* 2012;7(3):e34232.
39. King M, Brock G, Lundell C. Clearance of mucus by simulated cough. *J Appl Physiol.* 1985;58(6):1776-1782.
40. Konrad F, Schreiber T, Brecht-Kraus D, Georgieff M. Mucociliary transport in ICU patients. *Chest.* 1994;105(1):237-241.

41. Kunz LIZ, Laperre TS, Snoeck-Stroband JB, Budulac SE, Timens W, Wijngaarden SV, Schrumpf JA, Rabe KF, Postma DS, Sterk PJ, Hiemstra PS. Smoking status and anti-inflammatory macrophages in bronchoalveolar lavage and induced sputum in COPD. *Respir Res.* 2011;12:34.
42. Laperre TS, Postma DS, Gosman MME, Snoeck-Stroband JB, ten Hacken NHT, Hiemstra PS, Timens W, Sterk PJ, Mauad T. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax.* 2006;61:115-121.
43. Leopold PL, O'Mahony MJ, Lian XJ, Tilley AE, Harvey BG, Crystal RG. Smoking is associated with shortened airway cilia. *Plos One.* 2009;4(12):1-11.
44. Littlejohn MC, Stiernberg CM, Hokanson JA, Quinn FB, Bailey BJ. The relationship between the nasal cycle and mucociliary clearance. *Laryngoscope.* 1992;20(2):117-120.
45. Macchione M, Saldiva PHNS. Células do epitélio respiratório. In: Fisioterapia do sistema respiratório. 1ª edição; São Paulo: Sarvier. 2006.p.247-256.
46. Mahakit P, Pumhirun P. A preliminary study of nasal mucociliary clearance in smokers, sinusites and allergic rhinitis patients. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1995;13(2):119-121.
47. Mendes ACC, Toscano CM, Barcellos RMS, Ribeiro LP, Ritzel JB, Cunha VS, Duncan BB. Custos do Programa de Tratamento do Tabagismo no Brasil. *Rev Saúde Pública.* 2016;50:66.
48. Meyer KC. Lung infections and aging. *Ageing Res Rev.* 2004;3:55-67.
49. Middleton ET, Morice AH. Breath carbon monoxide as an indication of smoking habit. *Chest.* 2000;117:758-763.

50. Miert EV, Sardella A e Bernard A. Biomarkers of early respiratory effects in smoking adolescents. *Eur Respir J*. 2011; 38:1287-1293.
51. Moran AR, Norimatsu Y, Dawson DC, MacDonald KD. Aqueous cigarette smoke extract induces a voltage-dependent inhibition of CFTR expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014; 306:284–291.
52. Moreira L.B., Fuchs FD, Moraes RS, Bredemeir M, Cardozo S. Prevalência de tabagismo e fatores associados em área metropolitana da região Sul do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1995; 29(1):46-51.
53. Naclerio RM, Meier HL, Kagey-Sobotka A, Adkinson NF Jr, Meyer DA, Norman PS. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Rev Respir Dis*. 1986;128(4): 597-602.
54. Nakagawa NK. Estudo dos efeitos de Sistema de umidificação em pacientes ventilados mecanicamente sobre as propriedades físicas do muco respiratório e sua transportabilidade por cílio e tosse [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo;1997.
55. Nakagawa NK, Franchini ML, Driusso P, Oliveira LR, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Mucociliary clearance is impaired in acutely ill patients. *Chest*. 2005;128(4):2772-2777.
56. Nakagawa NK, Macchione M, Petrolino HM, Guimaraes ET, King M, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Effects of a heat and moisture exchanger and a heated humidifier on respiratory mucus in patients undergoing mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2000;28:312-317.
57. Nakagawa NK, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Mecanismo de defesa pulmonar. In: Nakagawa NK, Barnabé, V, editores. Fisioterapia do sistema

- respiratório. São Paulo: Sarvier; 2006. p. 207-228.
58. Nakagawa NK, Goto DM, Torres GM, Oliveira JP, Santos AS, Wilson SR, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Saccharine transit time test is dependent on the day period in nonsmokers. *Respir Therapy*. 2010;5(4):34-38.
 59. Nicola ML, Carvalho HB, Yoshida CT, Anjos F, Nakao M, Santos UP, Young “healthy” smokers have functional and inflammatory changes in the nasal and lower airways. *Chest*. 2014;145(5):998-1005.
 60. Noah TL, Zhou H, Monaco J, Horvath K, Herbst M, Jaspers I. Tobacco smoke exposure and altered nasal responses to live attenuated influenza vírus. *Environ Health Perspect*. 2011; 119(1):78-83.
 61. Oliveira-Maul JP, Carvalho HB, Goto DM, Maia RM, Fló C, Barnabe V, Franco DR, Benabou S, Perracini MR, Jacob-Filho W, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G, Rubin BK, Nakagawa NK. Aging, diabetes and hypertension are associated with decreased nasal mucociliary clearance. *Chest*. 2013;143(4):109.
 62. Pagliuca G, Rosato C, Martellucci S, de Vincentiis M, Greco A, Fusconi M, Virgilio AD, Gallipoli C, Simonelli M, Gallo A. Cytologic and functional alterations of nasal mucosa in smokers: temporary or permanent damage? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;152(4):740-745.
 63. Piotrowska WJ, Kurmanowska Z, Marczak Z, Gorski P, Antczak A. Rhinosinusitis in COPD: symptoms, mucosal changes, nasal lavage, cells and eicosanoids. *Int J COPD*. 2010;5:107-117.
 64. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. *Eur Respir J*. 1995;8(8):1333-1338.
 65. Proença M, Pitta F, Koveliis D, Mantoni LC, Furlanetto KC, Zabatiero J,

- Ramos D, Ramos EM. Mucociliary clearance and its relation with the level of physical activity in daily life in healthy smokers and nonsmokers. *Rev Port Pneumol*. 2012;18(5):233-238.
66. Ramos EMC, Toledo AC, Xavier RF, Fosco LC, Vieira RP, Ramos D, Jardim JR. Reversibility of impaired nasal mucociliary clearance in smokers following a smoking cessation programme. *Respirology*. 2011;16:849-855.
67. Ramos FL, Krahne JS, Kim V. Clinical issues of mucus accumulation in COPD. *Int J COPD*. 2014;9:139-150.
68. Reichert J, de Araújo AJ, Gonçalves CM, Godoy I, Chatkin JM, Sales Mda P, Santos SRRA. Brazilian smoking cessation guidelines 2008 (Diretrizes para a cessação do tabagismo no Brasil). *J Bras Pneumol*. 2008;34(10):845-880.
69. Rodrigues FMM, Ramos D, Xavier RF, Ito JT, Souza AP, Fernandes RA, Cecchini R, Macchione M, Toledo-Arruda AC, Guarnier FA, Ramos EMC. Nasal and systemic inflammatory profile after short term smoking cessation. *Respir Med*. 2014;108:999-1006.
70. Rubin BK, Ramirez O, Zayas JG, Finegan B, King M. Respiratory mucus from asymptomatic smokers is better hydrated and more easily cleared by mucociliary action. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145:545-547.
71. Sayier A, Hague C, Ajlan A, Leipsic J, Wierenga L, Krowchuk NM, Ceylan N, Sayiner A, Sin DD, Coxson HO. Bronchiolitis in young female smokers. *Respir Med*. 2013;107:732-738.
72. Stanley PJ, Wilson R, Greenstone MA, MacWilliam L, Cole PJ. Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. *Thorax*. 1986;41:519-523.

73. Swan GE, Hodgkin JE, Roby T, Mittman C, Jacobo N, Peters J. Reversibility of airways injury over a 12-month period following smoking cessation. *Chest*. 1992;101(3):607-612.
74. Takeyama K, Jung B, Shim JJ, Burgel P, Dao-Pick T, Ueki IF, Protin U, Kroschel P, Nadel JA. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:165-172.
75. Tamashiro E, Xiong G, Anselmo-Lima WT, Kreindler JL, Palmer JN, Cohen NA. Cigarette smoke exposure impairs respiratory epithelial ciliogenesis. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(2):117-122.
76. Tanni SE, Pelegriño NRG, Angeleli AYO, Correa C, Godoy I. Smoking status and tumor necrosis factor- α mediated systemic inflammation in COPD patients. *J Inflamm*. 2010;7(29):1-7.
77. Verra F, Escudier E, Lebargy F, Bernaudin JF, Crmoux H, Bignon J. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:630-634.
78. Virgin FW, Azbell C, Schuster D, Sunde J, Zhang S, Sorscher EJ, Woodworth BA. Exposure to cigarette smoke condensate reduces calcium activated chloride channel transport in primary sinonasal epithelial cultures. *Laryngoscope*. 2010;120(7):1465-1469.
79. Xiao J, Wang K, Feng Y, Chen X, Xu D, Zhang M. Role of extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ in cigarette smoke-induced mucus hypersecretion in rat model. *Chin Med J*. 2011;124(20):3327-3333.
80. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukagauchi K,

- Narita N. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*. 1997;112(2):505-510.
81. Willemse BWM, ten Hacken NHT, Rutgers B, Lesman-Leegte IGAT, Timens W, Postma DS. Smoking cessation improves both direct and indirect airway hyperresponsiveness in COPD. *Eur Respir J*. 2004; 24:391-396.
82. Willemse MWM, Hacken NHT, Rutgers B, Lesman-Leegte IGAT, Postma DS, Timens W. Effects of 1-years smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J*. 2005;26:835-845.
83. Wise RA, Kanner RE, Lindgren P, Connett JE, Altose MD, Enright PL, Tashkin. The effects of smoking intervention and an inhaled bronchodilator on airways reactivity in COPD: the lung healthy study. *Chest*. 2003;124(4):449-458.
84. Wang H, Liu X, Umino T, Skold CM, Zhu Y, Kohyama T, Spurzem JR, Romberger DJ, Rennard SI. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25:772-779.
85. World Health Organization. WHO report on the Global Tobacco Epidemic, 2008. Geneva: WHO; 2008. Disponível em: <http://www.who.int>.
86. Zayas JG, Man GCW, King M. Tracheal mucus rheology in patients undergoing diagnostic bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141:1107-1113.
87. Zhou H, Wang X, Brighton L, Hazucha M, Jaspers I, Carson JL. Increased nasal epithelial ciliary beat frequency associated with lifestyle tobacco smoke exposure. *Inhal Toxicol*. 2009;21(10):875-881.
88. Zhou Z, Chen P, Peng H. Are healthy smokers healthy? *Tob Induc Dis*.

2016;14:35.

APÊNDICE 1. Artigo publicado