Marina Lazzari Nicola

Efeitos do tabagismo sobre o transporte mucociliar nasal, propriedades físicas do muco, pH do condensado do ar exalado, celularidade e citocinas de lavado nasal em jovens

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

2014

Marina Lazzari Nicola

Efeitos do tabagismo sobre o transporte mucociliar nasal, propriedades físicas do muco, pH do condensado do ar exalado, celularidade e citocinas de lavado nasal em jovens

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

(versão corrigida – Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está na biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nicola, Marina Lazzari
Efeitos do tabagismo sobre o transporte mucociliar nasal, propriedades físicas do muco, pH do condensado do ar exalado, celularidade e citocinas de lavado nasal em jovens / Marina Lazzari Nicola. -- São Paulo, 2014.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências da Reabilitação.
Orientadora: Naomi Kondo Nakagawa.

Descritores: 1.Tabagismo 2.Transporte mucociliar 3.Muco 4.Mucosa nasal 5.Inflamação 6.Adulto jovem

USP/FM/DBD-032/14

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Dra. Naomi Kondo Nakagawa pela oportunidade de fazer o Mestrado sob sua orientação, por ter acreditado no meu potencial, por todo aprendizado e dedicação nesses anos de convívio. Serei sempre grata à sua dedicação para minha formação na área de pesquisa.

Aos professores Dr. Heráclito Barbosa Carvalho e Dr. Ubiratan de Paula Santos pela colaboração na análise estatística e interpretação dos resultados do trabalho.

Aos profissionais e professores do Ambulatório de Cessação do Tabagismo, Dr. Gustavo Faibischew Prado, Dra. Stella R. Martins e Dra. Analuci Silva pela oportunidade de discussão e aprendizado.

Às Dras. Mariângela Macchione e Regiani Carvalho de Oliveira pelo apoio e incentivo em todos os momentos deste trabalho.

Ao laboratório de Ciências da Reabilitação (LIM 34) e em especial ao laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM 5) pela colaboração e disponibilidade de espaço para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação e às secretárias Ana Nakazone e Marilisa Fernandes pela atenção e auxílio nas dúvidas e questões burocráticas.

À bibliotecária Valéria de Vilhena Lombardi pela atenção e elaboração da ficha catalográfica. À Valéria de Vilhena Lombardi e Márcia Arruda pelo auxílio na obtenção de artigos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos amigos de trabalho e alunos Danielle Miyuki Goto, Janaína Proença Oliveira-Maul, Cristiane Mayumi Kazama, Carolina Tieko Yoshida, Daniele Morais, Iracema Umeda, Lays Magalhães Braga, Michelle Lisidati Franchini, Tômas de Santana Carvalho, Juliana Araújo Nascimento, Tatiana Satie Kawaushi, Daniela Utyiama, Matheus Sá, Fabyana dos Anjos, Kelly Yoshizawa e Robson Seriani por todo apoio e auxílio na realização deste trabalho e com quem pude contar e compartilhar momentos de alegrias, angústias e aprendizado nesses anos de trabalho.

Aos meus pais, Mauro Nicola e Anair Lazzari Nicola, sem vocês não chegaria até aqui, em especial à minha mãe e melhor amiga pelo apoio incondicional em todos os momentos, pelo incentivo para ingressar na área de pesquisa e pelo exemplo que procuro seguir e admiro com tanto carinho.

Ao meu querido irmão, Matheus Lazzari Nicola pelo apoio, carinho e ajuda sempre que precisei.

Às minhas queridas amigas Dariane da Rosa e Talita Pasqualini que sempre estiveram ao meu lado e sei que sempre torceram por mim. Muito obrigada pela amizade e todo o apoio que recebi em todos os momentos.

E principalmente, meu especial agradecimento a todos os voluntários que participaram do nosso estudo, sem vocês não seria possível concluir este trabalho.

A todos que ajudaram, participaram e torceram por mim o meu muito obrigada e eterna gratidão, vocês ajudaram a concluir mais uma etapa da minha vida!!

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 Valéria de Vilhena Lombardi, Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia Lourenção Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso. 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
Lista de símbolos e unidades
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Abstract

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Produtos do cigarro e efeitos sobre a saúde 2

1.2 Mecanismos de defesa do sistema respiratório e produtos do cigarro 3

1.2.1 Barreira epitelial 4

1.2.2 Resposta celular 4

1.2.3 Transporte mucociliar e produtos do cigarro 6

2. OBJETIVOS 11

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 12

3.1 Desenho do estudo 12

3.2 Sujeitos do estudo 12

3.3 Avaliação 13

3.3.1 Questionário de saúde geral 14

3.3.2 Questionário SNOT-20 14

3.3.3 Exame físico 14

3.3.4 Espirometria 15

3.3.5 Transporte mucociliar nasal por meio do Teste da Sacarina 16

3.3.6 Coleta e análise do muco nasal: ângulo de contato 17

3.3.7 Coleta e análise do pH do condensado do ar exalado.....19

3.3.8 Coleta e análise do lavado nasal 20

3.3.8.1 Contagem total e diferencial das células do lavado nasal..... 22

3.3.8.2 Quantificação de citocinas e cotinina no lavado nasal..... 22

3.4 Análise estatística 23

4. RESULTADOS.....25

5. DISCUSSÃO.....33

6. CONCLUSÕES 44

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 45

8. ANEXOS.....56

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ângulo de contato
CO	Monóxido de carbono
CVF	Capacidade vital forçada
DP	Desvio padrão
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EBC	Condensado do ar exalado – *Exhaled breath condensate*
f	Frequência respiratória
FC	Frequência cardíaca
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corporal
IQR	Interquartil
LN	Lavado nasal
MPO	Mieloperoxidase
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
TMC	Transporte mucociliar
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
STT	Teste de trânsito da sacarina – *Saccharin transit test*
SNOT-20	Avaliação de Resultados Nasossinusais (*20-Item Sino-nasal Outcome Test)*
SpO_2	Saturação periférica de oxigênio
VEF_1	Volume expirado forçado no primeiro segundo
VEF_1/CVF	Razão entre volume expirado forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

º	Grau
ºC	Grau Celsius
%	Porcentagem
bpm	Batimentos por minuto
Cl^-	Íons cloreto
cm	Centímetro
l	Litro
l/min	Litro por minuto
mg	Miligrama
ml	Mililitro
ml/min	Mililitro por minuto
Na^+	Íons sódio
ng/ml	Nanograma por mililitro
pg/ml	Picograma por mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
rpm	Respirações por minuto
ppm	Partes por milhão
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático do transporte mucociliar adaptado e com permissão de Nakagawa et al. (1997) 7

Figura 2. Teste de tempo de trânsito da sacarina: (A) deposição da sacarina e (B) cronometragem do tempo 17

Figura 3. Coleta do muco nasal *in situ*: (A) por meio de um pincel e (B) retirada de muco do pincel com auxílio de uma agulha 18

Figura 4. Esquema de: (A) equipamento de análise do ângulo de contato: (a) um foco de luz fria, (b) um estereomicroscópio, (c) uma câmera e (d) um computador com o programa de análise de medidas, e (B) da análise do ângulo de contato: (a) no primeiro minuto após deposição do muco sobre a lâmina e (b) no quinto minuto 19

Figura 5. (A) Paciente sentado submetido à coleta do condensado do ar exalado e (B) fluido coletado ao final de 15 minutos 20

Figura 6. Coleta do lavado nasal: (A) instilação de solução salina (0,9% NaCl) em voluntário com extensão de cabeça e (B) remoção voluntária do fluido nasal 22

Figura 7. Diagrama esquemático de recrutamento e inclusão de voluntários no estudo de acordo com o CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*) 25

Figura 8. Resultados das 20 questões do SNOT-20 dos grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) por meio do teste Qui-quadrado 28

Figura 9. Diferença do transporte mucociliar nasal por meio do teste de trânsito da sacarina entre os jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) por meio do teste ANOVA 29

Figura 10. Ângulo de contato entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) por meio do teste ANOVA 29

Figura 11. Diferença no potencial hidrogeniônico (pH) do condensado do ar exalado entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) por meio do teste ANOVA 32

Figura 12. Associação entre carga tabágica (anos-maço) e potencial hidrogeniônico (pH) do condensado do ar exalado por meio de Correlação de Spearman 32

Figura 13. Equação de potencial hidrogeniônico (pH) do condensado do ar exalado esperado de acordo com a carga tabágica (anos-maço) segundo a regressão linear 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise comparativa de dados demográficos, anos de tabagismo, carga tabágica, monóxido de carbono (CO) exalado, nível de cotinina em lavado nasal e dados clínicos (média ± DP, mediana e IQR ou %, quando apropriados) entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) 26

Tabela 2. Valores médios (± DP) de volume forçado expirado no primeiro segundo (VEF_1) absoluto (l) e predito (%), de capacidade vital forçada (CVF) absoluto (l) e predito (%) e da razão entre o volume forçado expirado no primeiro segundo sobre a capacidade vital forçada (VEF_1/CVF) absoluto (l) e predito (%) e análise comparativa entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) 27

Tabela 3. Análise comparativa de número (média ± DP ou mediana e IQR, quando apropriados) de células totais e diferenciais do lavado nasal entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) 30

Tabela 4. Análise comparativa de concentração de citocinas (média ± DP ou mediana e IQR, quando apropriados) em lavado nasal entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou

maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) 31

Tabela 5. Resultados de estudos de transporte mucociliar nasal por meio do teste de trânsito da sacarina em indivíduos não tabagistas e tabagistas 36

Tabela 6. Resultados de estudos de potencial hidrogeniônico (pH) de condensado do ar exalado em indivíduos não tabagistas e tabagistas e em doenças respiratórias 41

RESUMO

Nicola ML. *Efeitos do tabagismo sobre o transporte mucociliar nasal, propriedades físicas do muco, pH do condensado do ar exalado, celularidade e citocinas de lavado nasal em jovens* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O tabagismo está fortemente associado ao desenvolvimento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, porém poucos estudos que relatam alterações funcionais ou inflamatórias nas vias aéreas superiores em jovens são encontrados na literatura. Nosso objetivo foi investigar as alterações funcionais e inflamatórias nas vias aéreas superiores e inferiores em jovens tabagistas com idade igual ou inferior a 35 anos. Setenta e dois indivíduos participaram do estudo: 32 jovens não tabagistas (JNT) saudáveis (21±4 anos, 29 homens) e 40 jovens tabagistas subdivididos de acordo com a carga tabágica: menor que 2,5 anos-maço (<2,5) (19±2 anos, 20 homens) e igual ou maior que 2,5 anos-maço (≥2,5) (24±5 anos, 17 homens e três mulheres). Foram avaliados os dados demográficos, os dados clínicos, os sintomas de desconforto das vias aéreas por meio do questionário SNOT-20, os volumes e capacidades pulmonares por meio do teste de função pulmonar, o transporte mucociliar nasal por meio do teste de tempo de trânsito da sacarina, a propriedade de superfície do muco nasal por meio do ângulo de contato, a inflamação na cavidade nasal por meio da contagem total e diferencial das células e citocinas em lavado nasal e a inflamação de vias aéreas inferiores por meio do pH do condensado do ar exalado. Observamos neste estudo que os jovens tabagistas ≥2,5 foram mais velhos comparados aos JNT e com os tabagistas <2,5 (p<0,01). Comparados com os JNT, os tabagistas ≥2,5 apresentaram maior índice de massa corporal (p=0,036), de frequência cardíaca (p=0,001) e de pressão arterial sistólica (p=0,036). Os tabagistas ≥2,5 apresentaram maior queixa sobre tosse (p=0,05) e secreção nasal escorrendo para a garganta (p=0,016) quando comparados com os JNT e tabagistas <2,5. Não encontramos diferenças significativas na pontuação total do questionário SNOT-20 (p=0,140), nos valores do teste de função pulmonar e nos valores do ângulo de contato (p=0,803) entre os grupos. O tempo de trânsito da sacarina foi significativamente menor nos jovens tabagistas (5,9±3,1 minutos) quando comparados aos JNT (7,7±4,1 minutos, p=0,033). Na análise do lavado nasal encontramos maior número de células totais em tabagistas <2,5 (48±14) e tabagistas ≥2,5 (37±25) comparados aos JNT (24±12, p<0,001). Encontramos também maior número de macrófagos (p=0,001), células ciliadas (p=0,008) e células caliciformes (p=0,004) nos tabagistas <2,5 e tabagistas ≥2,5 quando comparados aos JNT, e maiores concentrações de mieloperoxidase nos tabagistas <2,5 comparados aos tabagistas ≥2,5 (p=0,005). Os valores do pH do EBC foram menores em tabagistas ≥2,5 (7,65±0,42) comparados com os tabagistas <2,5 (7,83±0,26) e com os JNT (7,90±0,21, p=0,038). Por meio de análise de regressão linear, verificamos um efeito dose-dependente significativo do tabagismo sobre a redução dos

valores do pH do EBC (r=-0,47, p<0,001). Concluímos que o tabagismo em jovens tabagistas com idade igual ou inferior a 35 anos induz alterações do transporte mucociliar nasal, inflamação nasal e inflamação em vias aéreas inferiores e que essas alterações estão associadas à carga tabágica.

Descritores: tabagismo, transporte mucociliar, muco, mucosa nasal, inflamação, adulto jovem.

ABSTRACT

Nicola ML. *Effects of smoking on nasal mucociliary clearance, mucus physical properties, pH of exhaled breath condensate, cellularity and cytokines in nasal lavage in young* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Cigarette smoking is strongly associated with the development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, but few studies that reported functional or inflammatory changes in upper airway in young are found in the literature. We aimed to evaluate the effects of smoking on nasal mucociliary clearance, the mucus surface property and if there is inflammation in the nasal cavity and lower airways in young smokers aged less than 35 years. Of the 200 individuals contacted by telephone, 72 individuals entered in the study: 32 healthy young nonsmokers (YNS) (21±4 years, 29 male) and 40 young smokers, subdivided according to smoking history: less than 2.5 pack-years (<2.5) (19±2 years, 20 male) and 2.5 pack-years or more (≥2.5) (24±5 years, 17 male and three female). We assessed demographic data, clinical data, SNOT-20 questionnaire for symptoms of airway discomfort, the volumes and lung capacities by the pulmonary function test, the nasal mucociliary clearance using the saccharine transit test, the mucus surface property by the contact angle, the inflammation in the nasal cavity by the total and differential count of cells and cytokines in nasal lavage and inflammation of the lower airways by the exhaled breath condensate pH. In this study, we observed that young smokers ≥2.5 were older compared to YNS and smokers <2.5 ($p<0.01$). Compared with YNS, smokers ≥2.5 had higher body mass index ($p=0.036$), heart rate ($p=0.001$) and systolic blood pressure ($p=.036$). Smokers ≥2.5 complained more about cough ($p=0.05$) and post-nasal discharge ($p=0.016$) when compared to YNS and smokers <2.5. No significant differences were found in the total score of the SNOT-20 ($p=0.140$), in the pulmonary function test and mucus contact angle ($p=0.803$) between groups. The saccharine transit time was significantly lower in young smokers (5.9±3.1 minutes) compared to YNS (7.7±4.1 minutes, $p=0.033$). The number of total cells in nasal lavage fluid were greater in smokers <2.5 (48±14) and smokers ≥2.5 (37±25) compared to YNS (24±12, $p<0.001$). We also found greater number of macrophages ($p=0.001$), ciliated cells ($p=0.008$) and goblet cells ($p=0.004$) in smokers <2.5 and smokers ≥2.5 compared to YNS and a higher concentration of myeloperoxidase in smokers <2.5 compared to smokers ≥2.5 ($p=0.005$). The EBC pH were lower in smokers ≥2.5 (7.65±0.42) compared with smokers <2.5 (7.83±0.26) and with YNS (7.90±0.21, $p=0.038$). Linear regression analysis confirmed a significant dose-dependent effect of smoking in decreasing EBC pH ($r= -0.47$, $p<0.001$). We conclude that cigarette smoking induces changes in nasal mucociliary clearance, nasal inflammation and inflammation in the lower airways in young smokers aged less than 35 years and these changes are associated with smoking history.

Descriptors: smoking, mucociliary clearance, mucus, nasal mucosa, inflammation, young adult

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Na época do descobrimento da América, verificou-se que os nativos cultivavam e consumiam o tabaco em cerimônias religiosas fumando rolos feitos com a planta do tabaco, denominada nicotina em homenagem a Jean Nicot. O hábito de fumar rapidamente se difundiu na Espanha, Portugal, França e Inglaterra (Hortense et al., 2008) e no início, o tabaco foi considerado uma erva com propriedades medicinais sendo utilizado no tratamento de úlceras e enxaqueca (DeLucia e Oliveira-Filho, 2004).

Na metade do século XX, a industrialização dos cigarros e diversas estratégias comerciais fizeram do tabagismo um sinônimo de poder e de *status* social (Araújo et al., 2004; Hortense et al., 2008). Diversos fatores foram identificados como fatores associados ao início do tabagismo como, por exemplo, homens, convivência com fumantes, curiosidade, baixa escolaridade e baixo nível socioeconômico (Opaleye et al., 2012). Porém, a partir da metade do século XX, estudos mostraram que o tabagismo era um vício e um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e respiratórias (Doll e Hill, 1950; Edwards, 1957; Bronte-Stewart, 1961; Planeta e Cruz, 2005).

O tabagismo é definido como uma doença crônica caracterizada pela dependência química e psicológica dos produtos do cigarro, principalmente a nicotina e considerado como a principal causa evitável de morte (WHO, 2008). Em 1997, o tabagismo foi inserido no Código Internacional de Doenças (CID-Z72-0) da Organização Mundial da Saúde por ser considerado um grave problema de saúde pública.

Em 2005, os custos gerados pelas internações hospitalares no Sistema Único de Saúde devido a doenças atribuídas ao tabaco foram estimados em 338,7 milhões de reais ou aproximadamente 8% dos custos totais com assistência médica para essas doenças (Pinto e Ugá, 2010).

As três principais causas de morte atribuídas ao tabagismo são: a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer de pulmão e doenças cardiovasculares (Ezzati e Lopez, 2003). Em todo o mundo, o tabagismo causa mais de 5 milhões de mortes por ano e estima-se que causará mais de 10 milhões de mortes até 2020, sendo que, aproximadamente 70% dessas mortes ocorrerão em países em desenvolvimento (CDC, 2008). Em indivíduos com idade igual ou superior a 35 anos, aproximadamente 14% das mortes foram atribuídas ao hábito de fumar. Uma morte em cada cinco mortes em homens e uma morte em cada 10 mortes em mulheres (Correa et al., 2009) são associadas ao tabagismo.

1.1 Produtos do cigarro e efeitos sobre a saúde

O cigarro apresenta em sua composição mais de 4.700 substâncias tóxicas (Dube e Green, 1982). Na fumaça, há presença de mais de 400 a 500 componentes como a nicotina, fenol, hidrocarbonetos aromáticos, metais pesados como chumbo, cádmio, arsênio, níquel e crómio (reconhecidos como elementos carcinogênicos), assim como monóxido de carbono, amônia, ácido cianídrico, óxidos de nitrogênio, aminas e aldeídos voláteis, cetonas, benzeno, entre outros (Stavrides, 2006; Viana et al., 2011).

O monóxido de carbono é um importante produto da queima do tabaco e no sistema circulatório, liga-se fortemente à hemoglobina e forma a carboxihemoglobina que contribui para a redução do transporte e da oferta de oxigênio aos tecidos resultando em redução do consumo de oxigênio (Guyton e Hall, 2006).

A nicotina é absorvida rapidamente pela mucosa oral e apresenta meia-vida de aproximadamente duas horas após a inalação. Um cigarro contém de seis a 11 mg de nicotina e o indivíduo ao fumar o cigarro recebe em média 1 a 3 mg. A degradação da nicotina é feita principalmente pelo fígado gerando a cotinina. A nicotina e seus metabólitos são excretados pelos rins, com velocidade da excreção dependente do pH urinário, quanto mais alcalina a urina, maior é a excreção (DeLucia e Oliveira-Filho, 2004). A nicotina induz a liberação de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) pela glândula suprarrenal promovendo respostas agudas sobre o sistema cardiovascular como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial, aumento da contratilidade e consequente aumento do débito cardíaco (Kumar et al., 2008).

1.2 Mecanismos de defesa do sistema respiratório e produtos do cigarro

A nicotina estimula os receptores nicotínicos de acetilcolina (Guyton e Hall, 2006) e no sistema respiratório esses receptores respondem à irritação causada pela fumaça do cigarro promovendo aumento da permeabilidade

das vias aéreas e liberação de histaminas resultando em broncoconstrição devido à contração da musculatura lisa brônquica (Kumar et al., 2008).

Para a defesa do sistema respiratório, diversos mecanismos de proteção estão presentes e atuantes, e entre eles a barreira epitelial, o transporte mucociliar, resposta celular e remoção pelo sistema linfático.

1.2.1 Barreira epitelial

O sistema respiratório pode ser dividido em duas porções, uma porção condutora, constituída pelas fossas nasais, nasofaringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos, e outra, como porção respiratória, que compreende os bronquíolos terminais, ductos alveolares e alvéolos. A porção condutora é revestida por epitélio pseudoestratificado colunar ciliado, denominado como epitélio respiratório (Junqueira e Carneiro, 2008).

O epitélio das vias aéreas é a primeira barreira mecânica contra os agentes agressores inalados. As partículas inaladas que podem ser nocivas ao organismo se depositam ao longo das vias aéreas de condução (nariz, nasofaringe, laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e bronquíolos terminais) e são aderidas à camada de muco que reveste o epitélio respiratório (Nakagawa et al., 2006).

1.2.2 Resposta celular

Os neutrófilos e macrófagos são células de defesa produzidas pelo

timo e pela medula óssea, com função de fagocitose e participação na resposta inflamatória. Em contato com partículas irritantes, o neutrófilo emite pseudópodos para encapsular a partícula e liberar enzimas proteolíticas e agentes bactericidas. Após essa ação, os neutrófilos são inativados e morrem. Os macrófagos quando ativados pelo sistema imune, exercem função fagocítica mais potente que os neutrófilos, sendo capazes de envolver partículas maiores que bactérias. Após a digestão das partículas os macrófagos podem eliminar os produtos residuais, sobreviver e exercer sua função. Nos alvéolos há um grande número de macrófagos vigilantes. Os macrófagos, responsáveis pela eliminação das partículas nocivas e microorganismos dos alvéolos podem migrar para o interstício septal, vasos linfáticos distais localizados nos bronquíolos respiratórios e atingir os linfonodos onde são eliminados por meio do sistema linfático (Guyton e Hall, 2006).

Os macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células epiteliais secretam algumas substâncias que podem desencadear ou modular o processo inflamatório por meio de citocinas ou mediadores inflamatórios. As citocinas podem ser classificadas de acordo com sua atividade e função biológica, sendo divididas em citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Kumar et al., 2008). Entre as citocinas que têm ação pró-inflamatória estão o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e as interleucinas (IL)-6, IL-8 e a mieloperoxidase (MPO) que atuam na fase inicial da resposta imunológica. Entre as citocinas que possuem ação anti-inflamatória estão IL-4 e IL-10 (Zeidel et al., 2002; Carpagnano et al., 2003; Comandini et al., 2009)

relacionadas com a proliferação e diferenciação dos linfócitos.

1.2.3 Transporte mucociliar e produtos do cigarro

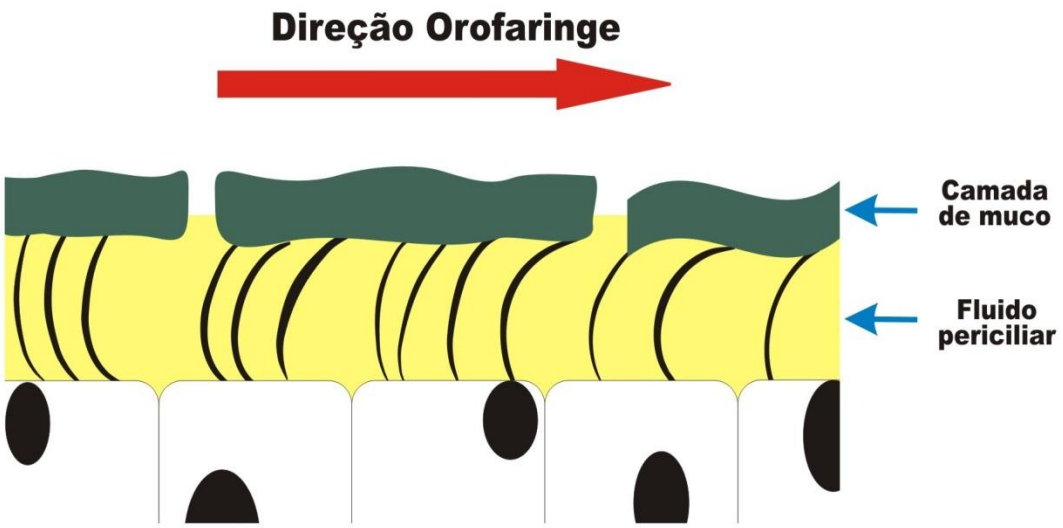
O transporte mucociliar (TMC) é um dos mecanismos de defesa do sistema respiratório que remove material particulado e microorganismos aderidos ao muco e transportados pelos cílios da região das vias aéreas inferiores e das vias aéreas superiores para a direção da orofaringe (Figura 1), onde serão eliminadas por meio da tosse ou da deglutição (Knowles e Boucher, 2002; Guyton e Hall, 2006; Nakagawa et al., 2006).

O TMC é composto de basicamente três componentes: (a) estrutura ciliar e batimento ciliar, (b) composição, quantidade e propriedades biofísicas do muco respiratório e (c) interação muco-cílio (Nakagawa, 1997).

As células ciliadas e as células produtoras de muco têm papel fundamental em diversas atividades de defesa do sistema respiratório. As células ciliadas estão presentes em grande número no epitélio respiratório, sendo que cada célula contém aproximadamente 200 cílios em sua superfície apical. O cílio é uma evaginação celular com proximidade a um grande número de mitocôndrias que fornecem adenosina trifosfato, substrato para o batimento ciliar. O cílio é formado por 10 pares de microtúbulos: nove pares de microtúbulos ao redor de um par de microtúbulos centrais (Nakagawa et al., 2006; Junqueira e Carneiro, 2008). Cada cílio tem de 5 a 50 µm de altura. O número de cílios e a altura deles vão diminuindo à medida que se seguem para a periferia.

O batimento ciliar ocorre em dois movimentos: efetivo com um movimento rápido de impulsão e extensão completa do cílio para frente para acoplamento do topo do cílio ao muco a ser transportado, em seguida, o movimento de recuperação, onde o cílio retorna inclinado no interior da camada periciliar, em paralelo a superfície epitelial, para a posição inicial (Nakagawa, 1997).

Figura 1. Desenho esquemático do transporte mucociliar, adaptado e com permissão de Nakagawa (1997)



Alterações de um elemento ou mais do TMC, como a associação de aumento da produção de muco com alterações do batimento ciliar, podem alterar a eficiência desse sistema e promover estase do muco no trato respiratório, o que aumenta a área e o tempo de contato de microorganismos e outros agentes agressores com o epitélio respiratório, que por sua vez, pode favorecer a colonização de bactérias e predispor os

indivíduos às infecções respiratórias, particularmente indivíduos vulneráveis (Konrad et al., 1995; Prescott et al., 1995; Meyer, 2004; Nakagawa et al., 2005; Oliveira-Maul et al., 2013).

Os produtos do cigarro podem induzir alterações agudas e crônicas sobre o epitélio ciliado pseudoestratificado do trato respiratório. Estudos clínicos e experimentais mostram que as principais alterações induzidas pelo cigarro são a hiperplasia e metaplasia das células ciliadas e caliciformes (Mullen et al., 1987; Gaworski et al., 1998; Hadar et al., 2009; Haswell et al., 2010), hipertrofia das glândulas da submucosa e aumento da produção de mucinas (Haswell et al., 2010; Dye e Adler, 1994) e alteração do batimento ciliar (Zhou et al., 2009; Piotrowska et al., 2010; Simet et al., 2010; Navarrette et al., 2012).

O muco é produzido pelas células caliciformes e por glândulas da submucosa do epitélio respiratório. O muco é composto por aproximadamente 95% de água e 5% de outras substâncias como mucinas, Na^+ e Cl^- e glicoproteínas (Nakagawa et al., 2006; Antunes e Cohen, 2007). O muco é formado pelo fluido periciliar que envolve os cílios e pela camada de muco propriamente dita disposta superiormente aos cílios e com distribuição heterogênea. Alterações no grau de hidratação do muco e na espessura da camada periciliar alteram o adequado funcionamento dos cílios e do transporte do muco (Nakagawa et al., 2006; Junqueira e Carneiro, 2008). Kreindler et al. (2005) mostraram que a exposição de células ciliadas do epitélio brônquico de humanos à fumaça do cigarro inibe o transporte de íons Cl- promovendo alterações na composição do muco semelhante às

encontradas em pacientes com fibrose cística.

O aumento da produção de muco pode levar à limitação do fluxo aéreo em tabagistas crônicos. Outras alterações associadas ao tabagismo podem ser responsáveis pelo estreitamento das vias aéreas como a broncoconstrição, a inflamação crônica das vias aéreas e o aumento da permeabilidade do epitélio respiratório (Saetta et al., 1994). Dessa forma, ocorre aumento da resistência de vias aéreas e redução do volume expirado forçado no primeiro segundo (VEF_1) e fluxo expiratório forçado médio ($FEF_{25-75\%}$).

Estudo experimental realizado em cultura de células epiteliais obtidas por meio de broncoscopia mostrou que os cílios de indivíduos tabagistas saudáveis são em média 10% menores quando comparados com indivíduos não tabagistas. A alteração do comprimento dos cílios pode apresentar uma influência significativa na redução do transporte do muco devido à inadequada interação muco-cílio (Leopold et al., 2009).

O diagnóstico de DPOC e alterações na função pulmonar são encontrados em indivíduos com idade superior a 35 anos e com histórico de tabagismo igual ou superior a 20 anos-maço (van Schayck et al., 2002; Flanders et al., 2003; Parkes et al., 2008). Na literatura, os efeitos do tabagismo sobre as vias aéreas e sobre o transporte mucociliar têm sido descritos em indivíduos com idade superior a 40 anos e/ou indivíduos com doenças sistêmicas associadas e/ou respiratórias como DPOC (Stanley et al., 1986; Mullen et al., 1987; Hadar et al., 2009; Piotrowska et al., 2010; Ramos et al., 2011).

Em jovens tabagistas os estudos encontrados sugerem que o tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento de bronquite crônica em homens (Cerveri et al., 2001) e bronquiolite em mulheres entre 20 e 30 anos (Sayiner et al., 2013). Em tabagistas com idade inferior a 35 anos o tabagismo foi apontado como o principal fator de risco na ocorrência de tosse crônica (Cerveri et al., 2003) e no desenvolvimento de sinais clínicos indicativos do primeiro estágio de DPOC (de Marco et al., 2007). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do tabagismo no TMC nasal em tabagistas assintomáticos com idade igual ou inferior a 35 anos.

A hipótese do nosso estudo é que jovens tabagistas com idade igual ou inferior a 35 anos apresentem similar fisiologia e função de vias aéreas superiores e inferiores que jovens não tabagistas. Porém caso ocorram alterações fisiológicas e funcionais em jovens tabagistas, que essas alterações sejam dependentes da carga tabágica.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Os objetivos desse estudo foram:

1) Caracterizar o transporte mucociliar nasal, propriedade de superfície do muco nasal, celularidade e citocinas na cavidade nasal, pH do condensado do ar exalado e função pulmonar em jovens tabagistas com idade igual ou inferior a 35 anos,

2) Comparar esses parâmetros funcionais e de inflamação de vias aéreas superiores e inferiores entre os tabagistas assintomáticos com idade igual ou inferior a 35 anos com jovens não tabagistas, e

3) Verificar se há associação entre carga tabágica e os parâmetros funcionais e de inflamação nas vias aéreas superiores e inferiores nos tabagistas com idade igual ou inferior a 35 anos.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. Casuística e Métodos

3.1 Desenho do estudo

Este estudo transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo protocolo número 147/13 (Anexo 1) e registrado no *ClinicalTrials.gov* (NCT01877291).

3.2 Sujeitos do estudo

A seleção dos voluntários foi de conveniência. Foram recrutados jovens tabagistas e não tabagistas de ambos os sexos, com idade entre 18 e 35 anos na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Por meio de contato telefônico, os indivíduos foram convidados a participar do estudo e foram incluídos no estudo após a concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

Os critérios de exclusão foram: (a) incapacidade de compreender e seguir comandos simples, (b) cirurgia prévia do nariz, (c) infecção respiratória nos 30 dias anteriores à entrada no estudo, (d) ex-tabagistas e (e) asma e propensão à asma. A exclusão dos voluntários com asma foi por meio do questionário *European Community Respiratory Health Survey - Screening Questionaire* (Anexo 3), validado para a língua portuguesa por Ribeiro et al. (2007). É composto por nove perguntas principais, sendo as

repostas dicotômicas (sim ou não) para cada questão. A classificação de propensão à asma é obtida pelo somatório (mínimo 0 e no máximo 9 pontos) das respostas afirmativas (pontuação igual a um), sendo a pontuação de corte do questionário igual ou superior a quatro. A classificação de não tabagistas saudáveis considerou os indivíduos que nunca fumaram cigarro ou outro produto derivado do tabaco, sem diagnóstico de doenças agudas ou crônicas e sem uso de medicamentos, exceto uso de contraceptivos orais, e com exame físico normal. Dentro do grupo de jovens não tabagistas (JNT), indivíduos que apresentaram monóxido de carbono (CO) exalado superior a 9 ppm ou nível de cotinina superior a 10 ng/ml no lavado nasal foram excluídos do estudo. A classificação de jovens tabagistas foi de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (2009): indivíduos que fumaram pelo menos 100 cigarros na vida e que atualmente fumam um cigarro por dia ou fumam ocasionalmente. Utilizamos também uma subdivisão do grupo de jovens tabagistas de acordo com a carga tabágica: menor que 2,5 anos-maço (<2,5) e igual ou maior que 2,5 anos-maço (≥2,5).

3.3 Avaliação

Todos os voluntários foram avaliados entre 7 e 12 horas no Laboratório de Defesa Pulmonar da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. A avaliação foi constituída de anamnese clínica por meio de questionários, exame físico, coleta de fluidos (muco nasal, lavado nasal e condensado do ar exalado) com análises específicas e

espirometria.

3.3.1 Questionário de saúde geral

Foram obtidas informações gerais sobre o histórico de saúde, os antecedentes pessoais e familiares, de tabagismo e alguns aspectos socioeconômicos (Anexo 4).

3.3.2 Questionário SNOT-20

Em seguida foi aplicado um questionário de avaliação de sintomas de rinossinusite e de desconforto das vias aéreas, denominado SNOT-20 (Piccirillo et al., 2002) validado para a língua portuguesa por Bezerra et al. (2011)(Anexo 5).

O questionário SNOT-20 é composto por 20 itens, sendo as respostas pontuadas como problemas em uma escala de zero a cinco: (0) nenhum, (1) muito pequeno, (2) pequeno, (3) moderado, (4) sério e (5) pior possível. A pontuação final de sintomas varia de 0 (nenhum) a 5 (máximo). Além disso, até cinco sintomas podem ser destacados separadamente de acordo com o julgamento do voluntário quanto à importância de interferência negativa em sua saúde.

3.3.3 Exame físico

Após o preenchimento dos questionários os voluntários permaneceram em repouso, sentados, durante cinco minutos para a coleta dos seguintes parâmetros clínicos:

(a) pressão arterial sistólica e diastólica (mmHg) foi aferida com esfigmomanômetro (Premium, Accumed, Rio de Janeiro, Brasil) e estetoscópio (Littimann, 3M, Saint Paul, Minnesota, USA) no membro superior esquerdo,

(b) frequência cardíaca (bpm) e saturação periférica de oxigênio (%) foram aferidas com auxílio de um oxímetro de pulso (BCI 3303, Smiths Medical, Ohio, USA) no dedo indicador direito durante um minuto,

(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 voluntários 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 de CO exalado foram expressos em ppm.

3.3.4 Espirometria

O teste de função pulmonar foi feito com o espirômetro (Koko Legend, Inspire Health Inc., Longmont, USA) utilizando as diretrizes da *American Thoracic Society*, para determinar o volume expiratório forçado no primeiro

segundo (VEF_1) e a capacidade vital forçada (CVF), com os valores absolutos e os valores preditos calculados a partir de estudo de Pereira et al. (2007) na população brasileira.

3.3.5 Transporte mucociliar nasal por meio do Teste da Sacarina

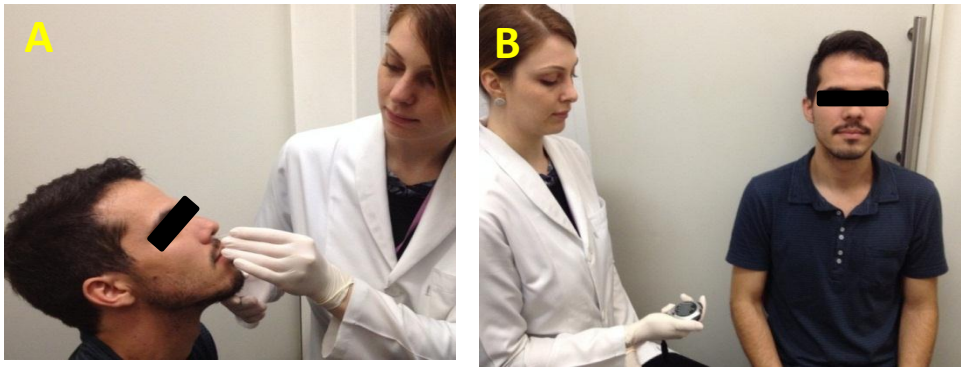
O TMC nasal pode ser avaliado pelo teste de trânsito da sacarina (STT) que é um teste simples, de baixo custo e acessível. A sacarina depositada na narina pode ser facilmente detectada pelo voluntário quando chega à orofaringe por meio da degustação (doce ou amargo). O valor normal atribuído ao STT em indivíduos adultos saudáveis é menor ou igual a 12 minutos (Oliveira-Maul et al., 2013).

Os voluntários foram avaliados em um ambiente tranquilo, com temperatura média entre 21 e 22ºC e com umidade relativa média de 63 a 71%, monitoradas com termo-higrômetro (Modelo TH 01, Impac Ind, China). O voluntário foi orientado a manter a respiração normal, evitar falar, tossir, fungar ou respirar profundamente durante o procedimento.

O voluntário, sentado em uma cadeira com encosto, realizou uma leve extensão de cabeça para depósito de 25 mg de sacarina na borda inferior da narina direita ou na narina de maior fluxo aéreo livre (Figura 2). Em seguida, o voluntário reposicionou a cabeça com o olhar no horizonte e foi acionado um cronômetro. No momento de relato de gosto doce ou amargo, a cronometragem foi interrompida. Caso o voluntário não sentisse o gosto da sacarina após 60 minutos, o procedimento seria interrompido e em seguida

testado a degustação da sacarina por meio de depósito de um grânulo de sacarina na ponta da língua. Em caso de teste positivo, o procedimento seria repetido após 24 horas (Nakagawa et al., 2005; Goto et al., 2010; Oliveira-Maul et al., 2013).

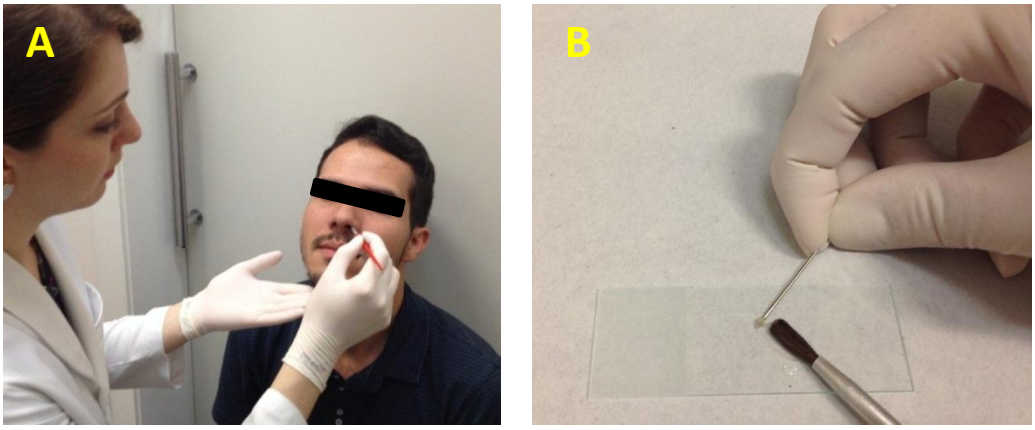
Figura 2. Teste de tempo de trânsito da sacarina: (A) deposição da sacarina e (B) cronometragem do tempo



3.3.6 Coleta e análise do muco nasal: ângulo de contato

Seguido do STT foi realizada a coleta do muco nasal, onde os voluntários foram orientados a realizar extensão de cabeça de aproximadamente 30º. O muco nasal foi coleado com auxílio de um pincel macio na narina oposta ao STT. As amostras de muco foram retiradas delicadamente por meio de uma agulha (Figura 3), armazenadas em tubos de polipropileno devidamente identificados e mantidas sob -80ºC até análise para ângulo de contato.

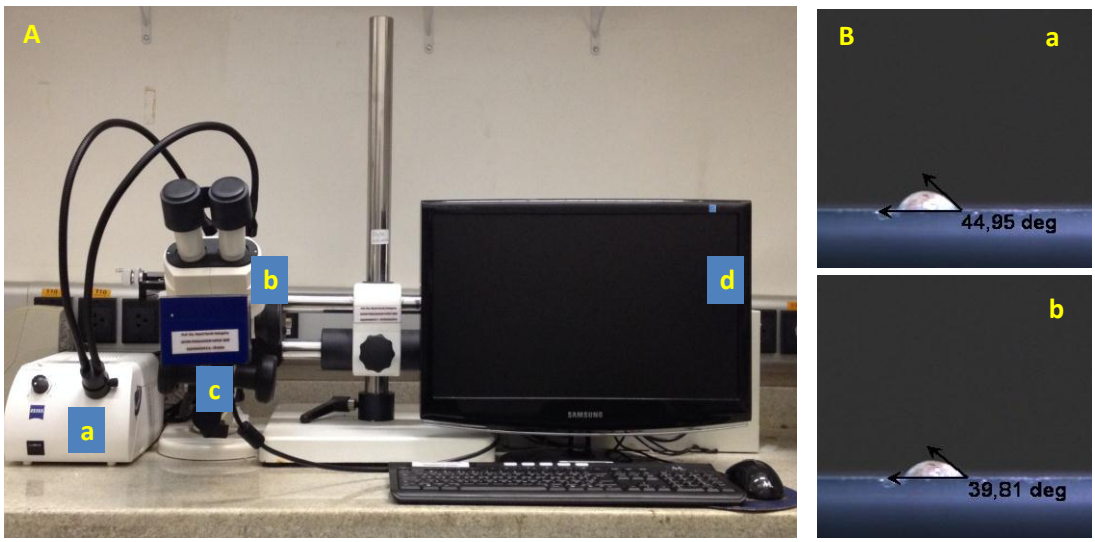
Figura 3. Coleta do muco nasal *in situ*: (A) por meio de um pincel e (B) retirada de muco do pincel com auxílio de uma agulha



Características como adesividade e "wettabilidade" representam propriedades físicas relevantes no transporte do muco através dos cílios e da tosse (Puchelle et al., 1987). Todo fluido biológico possui a propriedade de se espalhar quando colocado sobre uma superfície sólida. Quanto maior o ângulo de contato (AC), menor é a "wettabilidade" e quanto maior o AC maior é a 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. O AC é o ângulo formado entre a tangente da interface ar-fluido e a superfície plana (lâmina de vidro). Esta análise foi descrita por Hills (1985) e por Puchelle et al. (1987). Para a análise do AC, utilizamos lâminas de vidro tratadas com solução sulfocrômica e lavadas com água deionizada. As amostras de aproximadamente 25 µl foram posicionadas com a ajuda de um estilete sobre a lâmina tratada. As medidas de ângulo de contato em graus (Figura 4) foram analisadas cinco minutos após a 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

(Stemi 2000C, Carl Zeiss, Göttinger, Germany) conectada a uma câmera (Axiocam HSC, Carl Zeiss, Göttinger, Germany). Foram realizadas três medidas para cada amostra, sendo a média o resultado final das medidas.

Figura 4. Esquema de: (A) equipamento de análise do ângulo de contato: (a) um foco de luz fria, (b) um estereomicroscópio, (c) uma câmera e (d) um computador com o programa de análise de medidas, e (B) da análise do ângulo de contato: (a) no primeiro minuto após deposição do muco sobre a lâmina e (b) no quinto minuto



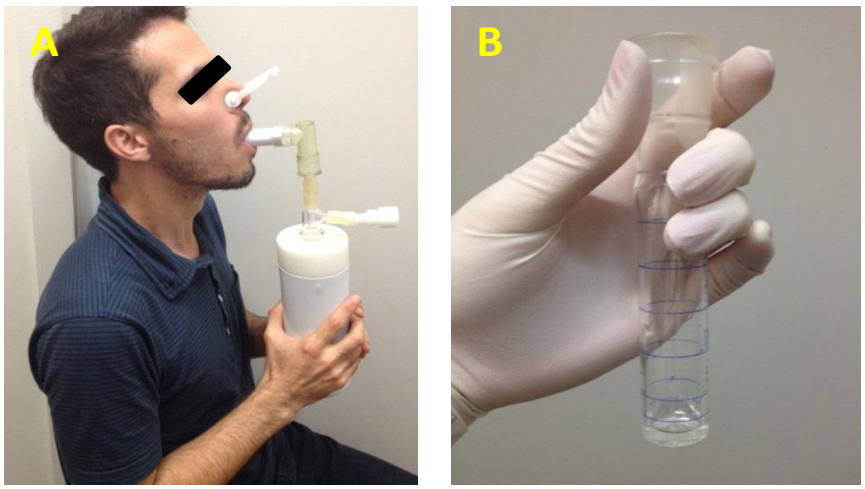
3.3.7 Coleta e análise do pH do condensado do ar exalado

Anteriormente à coleta do condensado do ar exalado (EBC) o voluntário foi orientado a realizar enxágue oral com água bidestilada, engolir a saliva e manter uma leve extensão de cabeça (aproximadamente 15º). Utilizando um clipe nasal o voluntário foi orientado a respirar normalmente por meio de um bocal conectado a um aparelho (Figura 5) que coleta o condensado com gelo seco (-78,5ºC). Aproximadamente, após 15 a 20

minutos, cerca de 1,5 a 2 ml de fluido exalado é coletado. As amostras foram armazenadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml e imediatamente após a coleta foi realizada análise de pH.

Previamente à leitura de pH, foi realizada a calibração do pHmetro (827 pH Lab, Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland) com pHs de 4, 7 e 9. A degaseificação da amostra (500 µl) foi realizada com gás argônio 99,9% (Gama Gases Ltd., São Paulo, Brasil) durante 15 minutos com fluxo de 350 ml/min. As amostras utilizadas para determinação do pH foram descartadas.

Figura 5. (A) Paciente sentado submetido à coleta do condensado do ar exalado e (B) fluido coletado ao final de 15 minutos



3.3.8 Coleta e análise do lavado nasal

Outra forma de detecção e caracterização de alterações bioquímicas associadas a patologias das vias aéreas é a utilização do lavado nasal (LN), um fluido biológico que possui componentes produzidos pelas células do

sistema imunológico (Naclerio et al, 1983; Peden, 1996; Belda et al., 2001).

Para coleta do LN, o voluntário foi orientado a não respirar durante o procedimento (10 segundos) e a não engolir a solução salina (0,9%) instilada. Os voluntários foram posicionados sentados em uma cadeira com extensão de cabeça de aproximadamente 30º, foi instilado 5 ml em cada narina de solução salina (0,9%) em temperatura ambiente com uma seringa. Os voluntários expeliram o LN em frascos plásticos estéreis, inclinando a cabeça para frente e assoando gentilmente as narinas (Figura 6). A amostra foi homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos com uma velocidade de 1.800 rpm e temperatura a 5ºC. Em seguida, o sobrenadante foi separado do “pellet” e imediatamente transferido para tubos de polipropileno estéreis, identificados e armazenados em freezer -80ºC para posterior determinação de concentração de citocinas e de cotinina. Ao “pellet” adicionamos 1 ml de PBS (solução tampão fostato salina) para posterior contagem total e diferencial de células.

Figura 6. Coleta do lavado nasal: (A) instilação de solução salina (0,9% NaCl) em voluntário com extensão e (B) remoção voluntária do fluido nasal

3.3.8.1 Contagem total e diferencial das células do lavado nasal

A contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer (20 µl de amostra, sob microscopia ótica (400x). Para a contagem diferencial de células, as amostras (100 µl) foram centrifugadas em cytospin durante seis minutos com velocidade de 1.000 rpm, 25ºC (Naclerio et al.,1983). O esfregaço foi corado em solução panótico e a leitura realizada em microscópio ótico (1.000x).

3.3.8.2 Quantificação de citocinas e cotinina no lavado nasal

As concentrações de fator de necrose tumoral (TNF)-α, interleucinas (IL)-4, IL-6, IL-8, IL-10, mieloperoxidase (MPO) e cotinina foram determinadas por meio de enzima-imunoensaio (ELISA), utilizando painéis

comerciais ultrassensíveis (Luminex panel, Billerica, MA, USA). Os limites de detecção foram 0,106 pg/ml para o TNF-α, 10 pg/ml para a IL-4, 0,039 pg/ml para a IL-6, 3,5 pg/ml para a IL-8, 0,5 pg/ml para a IL-10, e 0,062 ng/ml para a MPO. O ajuste da curva padrão foi entre 0 e 32 pg/ml para o TNF-α, entre 31,2 e 2.000 pg/ml para a IL-4, entre 0 e 10 pg/ml para a IL-6, entre 0 e 2.000 pg/ml para a IL-8, entre 0 e 50 pg/ml para a IL-10 e entre 0,156 e 10 ng/ml para a MPO. A determinação da concentração de cotinina no LN foi realizada por meio de enzima-imunoensaio (High Sensitivity Cotinine Immunoassay, DRG International, Inc., Marburg, Germany). O limite inferior de detecção foi 0,1 ng/ml e o ajuste da curva padrão foi entre 0 e 50 ng/ml.

3.4 Análise estatística

Os valores com distribuição normal foram expressos como média ± desvio padrão (DP). Os valores com distribuição não-paramétrica foram expressos como mediana e interquartil (IQR).

Comparações entre os grupos JNT, e JT<2,5 e JT≥2,5 foram analisadas pelo Teste One Way ANOVA com correção de Bonferroni ou o Teste de Kruskal-Wallis quando apropriado.

O teste do Qui-quadrado foi utilizado para análise de gênero e para a análise isolada das 20 questões do questionário SNOT-20.

Correlações entre as variáveis foram analisadas utilizando Coeficiente de Correlação de Pearson ou Spearman quando apropriado.

A regressão linear foi utilizada para analisar o pH do condensado do

ar exalado ajustado para idade e carga tabágica (anos-maço). A diferença foi considerada estatisticamente significante se $p < 0,05$.

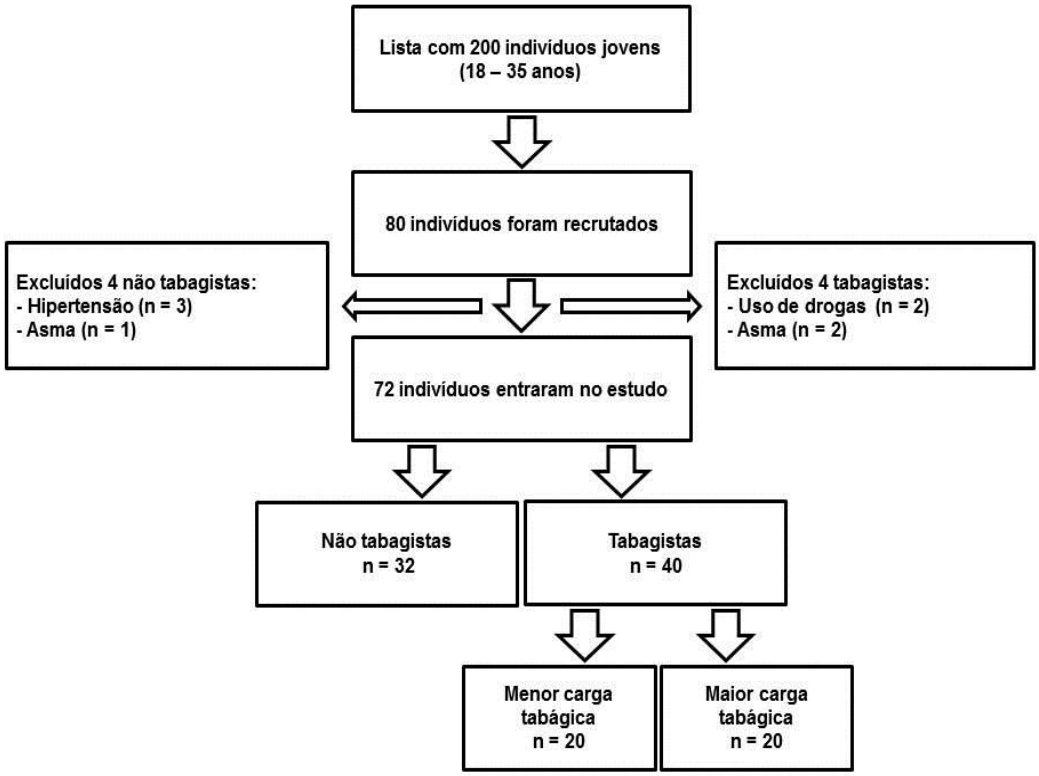
O cálculo amostral de $n = 18$ para cada grupo foi obtido por meio da variável STT (valor médio normal de 9 minutos, desvio-padrão de 3 minutos), sendo uma diferença de 3 minutos considerada clinicamente significante. O poder utilizado foi de 80% e o α de 0,05.

4. RESULTADOS

4. Resultados

A partir de uma lista de 200 indivíduos recrutados por meio de contato telefônico, 80 voluntários concordaram em participar do estudo (Figura 7). Desses, oito voluntários foram excluídos (quatro não tabagistas e quatro tabagistas). Portanto 72 jovens concluíram o estudo (32 não tabagistas e 40 tabagistas).

Figura 7. Diagrama esquemático de recrutamento e inclusão de voluntários no estudo de acordo com o CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*)



Observamos diferenças demográficas e clínicas entre os JNT, JT<2,5 e JT≥2,5 (Tabela 1). Os JT≥2,5 foram mais velhos comparados aos JNT e

com os JT<2,5. Valores de CO exalado e de níveis de cotinina no LN de todos os JNT saudáveis mostraram valores baixos e confirmaram a condição relatada de não tabagista. Os tabagistas apresentaram valores elevados de CO exalado e de concentração de cotinina no LN. Comparados com os JNT, os JT≥2,5 apresentaram maior índice de massa corporal (IMC), de frequência cardíaca (FC) e de pressão arterial sistólica (PAS). A saturação periférica de oxigênio (SpO_2) foi similar entre os JNT, JT<2,5 e JT≥2,5.

Tabela 1. Análise comparativa de dados demográficos, anos de tabagismo, carga tabágica, monóxido de carbono (CO) exalado, nível de cotinina em lavado nasal e dados clínicos (média ± DP, mediana e IQR ou %, quando apropriados) entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5)

	JNT n = 32	**JT<2,5 n = 20**	**JT≥2,5 n = 20**	**ANOVA p**
Idade, anos, média (DP)	21 (4)†	19 (2)†	24 (5)	<0,001
Gênero, n masculino, (%)	29 (91)	20 (100)	17 (85)	0,220*
IMC, kg/m^2, média (DP)	22,6 (2,6)†	23,4 (2,6)	24,6 (2,5)	0,036
Anos de tabagismo, mediana (IQR)	NA	3 (2)†	7 (5)	<0,001¥
Anos-maço, mediana (IQR)	NA	0,7 (0,9)†	6,0 (4,2)	<0,001¥
CO exalado, ppm, média (DP)	0,7 (1,1)†	1,5 (0,8)†	9,3 (5,9)	<0,001
Cotinina, ng/ml, mediana (IQR)	1,00 (1,05)£†	8,61 (10,59)†	12,14 (15,61)	<0,001
PAS, mmHg, média (DP)	113 (9)†	114 (10)	120 (7)	0,036
PAD, mmHg, média (DP)	76 (10)	73 (7)	76 (9)	0,489
FC, bpm, média (DP)	64 (13)†	67 (11)	75 (12)	0,001
SpO_2, %, média (DP)	97 (1)	97 (1)	97 (2)	0,998

Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal, CO, monóxido de carbono exalado, PAS, pressão arterial sistólica, PAD, pressão arterial diastólica, FC, frequência cardíaca, SpO_2, saturação periférica de oxigênio, NA, não se aplica, *, Qui-quadrado, ¥, Teste de Mann-Whitney, †, *vs* JT≥2,5, £, *vs* JT<2,5.

No teste de função pulmonar (Tabela 2) não observamos diferenças significativas nos valores absolutos ou preditos de VEF_1 , na CVF e no índice de VEF_1/CVF entre os JNT, JT<2,5 e JT≥2,5.

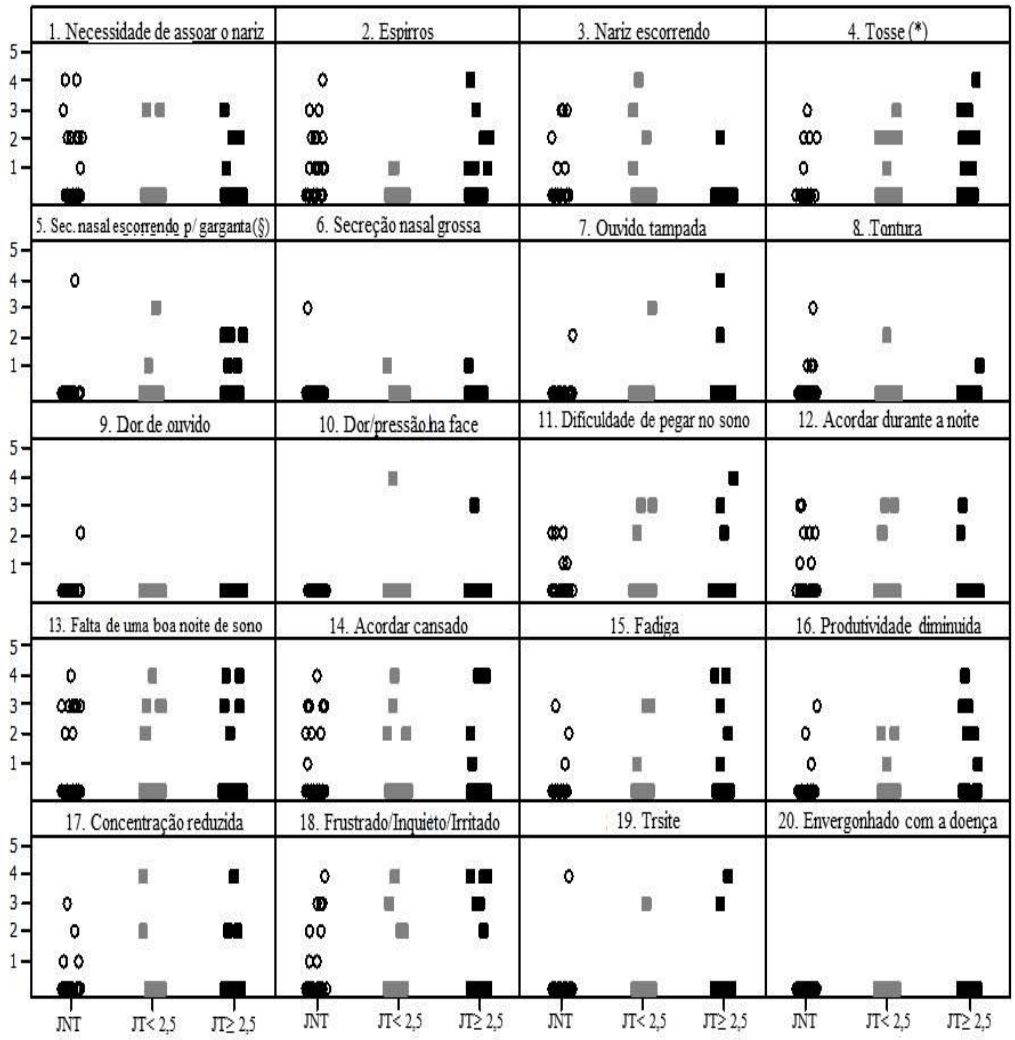
Tabela 2. Valores médios (± DP) de volume forçado expirado no primeiro segundo (VEF_1) absoluto (l) e predito (%), de capacidade vital forçada (CVF) absoluto (l) e predito (%) e da razão entre o volume forçado expirado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada (VEF_1/CVF) absoluto (l) e predito (%) e análise comparativa entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5)

	JNT n = 32	**JT<2,5 n = 20**	**JT≥2,5 n = 20**	**ANOVA valor de p**
VEF_1, litros	4,24 (0,62)	4,08 (0,59)	3,93 (0,72)	0,427
VFE_1 % predito	96,8 (8,6)	87,7 (15,7)	93,7 (10,9)	0,164
CVF, litros	4,96 (0,86)	5,10 (0,57)	4,94 (0,91)	0,928
CVF % predito	100,5 (9,7)	98,2 (12,1)	103,5 (17,1)	0,677
VEF_1/CVF	0,86 (0,07)	0,80 (0,09)	0,80 (0,09)	0,078
VEF_1/CVF %, predito	94,0 (8,8)	85,2 (9,3)	89,4 (10,3)	0,092

Abreviaturas: VEF_1, volume expirado forçado no primeiro segundo, CVF, capacidade vital forçada, VEF_1/CVF, razão entre o volume expirado forçado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada.

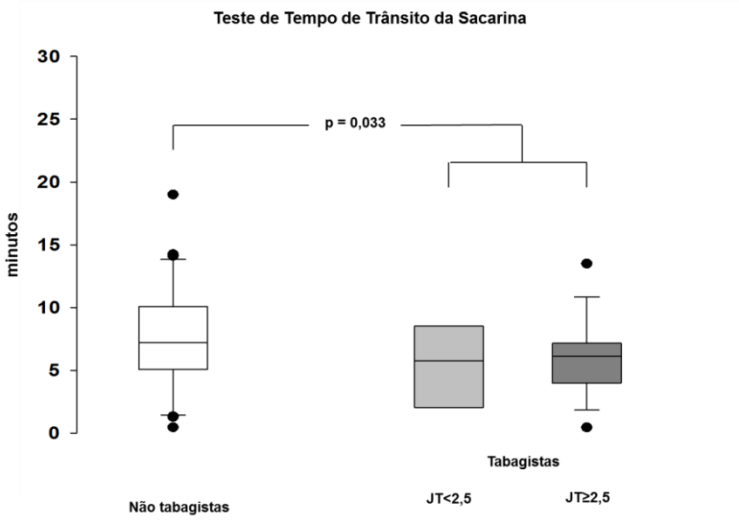
Os resultados individuais das 20 questões do questionário SNOT-20 estão na Figura 8. Na pontuação total do questionário SNOT-20 não houve diferença significativa entre os JNT (0,37 ± 0,34), JT<2,5 (0,36 ± 0,33) e JT≥2,5 (0,63 ± 0,64, p = 0,140). Os JT≥2,5 apresentaram maior queixa sobre tosse (p = 0,05) e secreção nasal escorrendo para a garganta (p = 0,016) quando comparados com os JNT e JT<2,5.

Figura 8. Resultados das 20 questões do SNOT-20 dos grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) por meio do teste Qui-quadrado



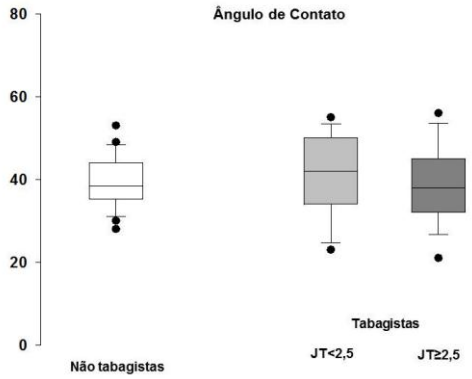
O STT (Figura 9) dos jovens tabagistas (5,9 ± 3,1 minutos) foi significativamente menor quando comparado aos JNT (7,7 ± 4,1 minutos, p = 0,033), sem diferenças entre os tabagistas com menor ou maior carga tabágica.

Figura 9. Diferença do transporte mucociliar nasal por meio do teste de trânsito da sacarina entre os jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) por meio do teste ANOVA



Os valores do ângulo de contato foram similares entre os jovens tabagistas (40 ± 9º) e os JNT (39 ± 6º, p = 0,803).

Figura 10. Ângulo de contato entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) por meio do teste ANOVA



Na análise do LN encontramos maior número de células totais em

JT<2,5 (48 ± 14) e JT≥2,5 (37 ± 25) comparados aos JNT (24 ± 12, p < 0,001), devido ao maior número de macrófagos (p = 0,001), de células ciliadas (p = 0,008) e de células caliciformes (p = 0,004) nos JT<2,5 e JT≥2,5 quando comparados aos JNT (Tabela 3).

Tabela 3. Análise comparativa de número (média ± DP ou mediana e IQR, quando apropriados) de células totais e diferenciais do lavado nasal entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5)

	JNT n = 32	**JT<2,5 n = 20**	**JT≥2,5 n = 20**	**ANOVA valor de p**
Células totais x10^6, mediana (IQR)	24 (12)£†	48 (14)	37 (25)	<0,001
Neutrófilos, mediana (IQR)	0 (0)	0 (2)	0 (1)	0,692
Eosinófilos, mediana (IQR)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,691
Linfócitos, mediana (IQR)	1 (1)	1 (2)	1 (2)	0,190
Macrófagos, média (DP)	14 (9)£†	28 (16)	22 (12)	0,001
Células ciliadas, média (DP)	10 (6)£†	20 (8)	15 (14)	0,008
Células caliciformes, mediana (IQR)	3 (3)£†	4 (4)	2 (4)	0,004

Abreviaturas: £, *vs* JT<2,5, †, *vs* JT≥2,5.

As concentrações de IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 foram similares entre os grupos (Tabela 4). Porém maior concentração de MPO foi encontrada nos JT<2,5 quando comparados aos JT≥2,5 (p = 0,005).

Tabela 4. Análise comparativa de concentração de citocinas (média ± DP ou mediana e IQR, quando apropriados) em lavado nasal entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5)

	JNT n = 32	**JT<2,5 n = 20**	**JT≥2,5 n = 20**	**ANOVA valor de p**
TNF-α, pg/ml, mediana (IQR)	0,08 (0,15)	0,19 (0,61)†	0,02 (0,03)	0,054€
IL-4, pg/ml, mediana (IQR)	0,46 (0,59)	0,37 (0,27)	0,31 (0,89)	0,656€
IL-6, pg/ml, mediana (IQR)	0,06 (0,03)	0,06 (0,03)	0,06 (0,00)	0,197€
IL-8, pg/ml, mediana (IQR)	53,26 (44,89)	117,42 (126,00)	27,31 (41,39)	0,148€
IL-10, pg/ml, mediana (IQR)	0,10 (0,19)	0,22 (0,53)	0,16 (0,24)	0,378€
MPO, ng/ml, média (DP)	21,51 (13,84)£	52,44 (15,84)†	22,84 (21,32)	0,005

Abreviaturas: TNF-α, fator de necrose tumoral alfa, IL-6, interleucina-6, IL-8, interleucina-8, IL-10, interleucina-10, MPO, mieloperoxidase, £, *vs* JT<2,5, †, *vs* JT≥2,5, € Teste de Kruskal-Wallis.

Os valores de pH do EBC (Figura 11) foram menores no grupo JT≥2,5 (7,65 ± 0,42) quando comparado com os grupos JT<2,5 (7,83 ± 0,26) e JNT (7,90 ± 0,21, p = 0,038). Encontramos correlação significativa entre o pH do EBC e a carga tabágica (r = -0,47 e p < 0,001)(Figura12). Por meio de análise de regressão linear verificamos um efeito significativo da carga tabágica sobre a redução dos valores do pH do EBC (Figura 13).

Figura 11. Diferença de potencial hidrogeniônico (pH) do condensado do ar exalado entre os grupos jovens não tabagistas (JNT), jovens tabagistas com carga tabágica menor que 2,5 anos-maço (JT<2,5) e jovens tabagistas com carga tabágica igual ou maior que 2,5 anos-maço (JT≥2,5) por meio do teste ANOVA

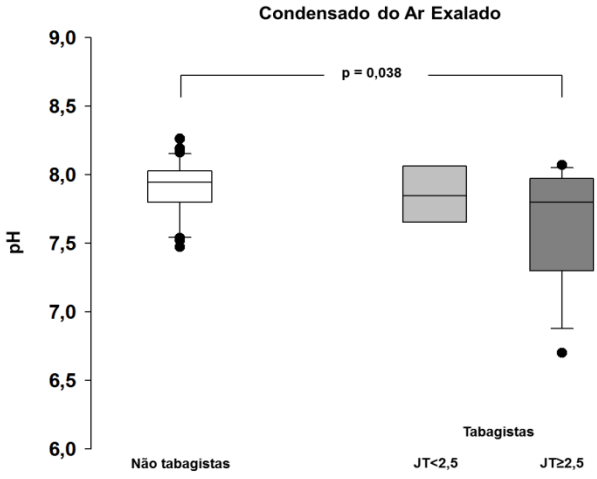


Figura 12. Associação entre carga tabágica (anos-maço) e potencial hidrogeniônico (pH) do condensado do ar exalado por meio de Correlação de Spearman

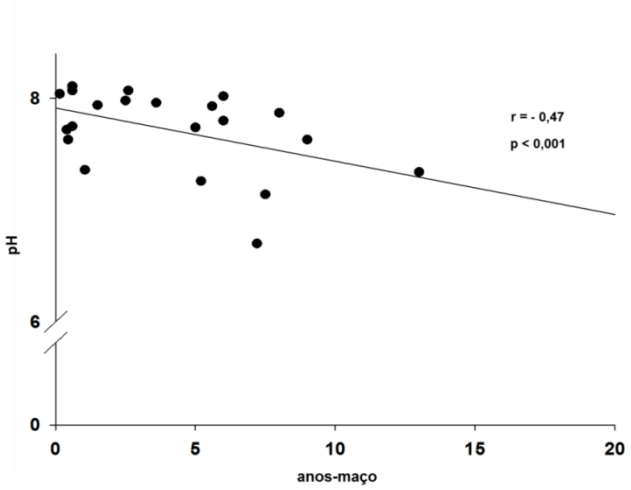


Figura 13. Equação de potencial hidrogeniônico (pH) do condensado do ar exalado esperado de acordo com a carga tabágica (anos-maço) obtido por regressão linear

pH esperado do EBC = 7,90 - (0,05 x anos-maço)

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

O presente estudo mostrou que jovens tabagistas assintomáticos apresentam alterações funcionais e inflamatórias nas vias aéreas superiores e inferiores, especificamente TMC nasal acelerado, aumento do número de células nasais (macrófagos, células ciliadas e células caliciformes), aumento na concentração de MPO e redução do pH do EBC comparados com jovens não tabagistas. Além disso, nós mostramos que estas alterações funcionais são dependentes da carga tabágica, onde para cada ano-maço ocorre uma redução de 0,05 no pH do EBC.

A mucosa nasal é a primeira barreira de defesa do sistema respiratório contra agentes inalados e apresenta elementos histológicos em comum com a mucosa brônquica (Kim e Rubin, 2008). O TMC eficiente remove partículas e elimina agentes agressores do sistema respiratório (Nakagawa et al., 2005). O STT foi o método utilizado em nosso estudo para avaliar a eficiência do TMC nasal por ser um teste não invasivo, simples, de baixo custo, reprodutível e é o método utilizado pelo nosso grupo de estudo há mais de 10 anos em diferentes condições clínicas (Puchelle et al., 1981, Nakagawa et al., 2010; Goto et al., 2010; Oliveira-Maul et al., 2013). No presente estudo os JT apresentaram o STT mais acelerado quando comparado aos JNT. Possivelmente jovens tabagistas assintomáticos e com baixa carga tabágica podem apresentar como forma de proteção aumento da frequência do batimento ciliar e do TMC nasal em resposta ao tabagismo, porém o envelhecimento e o tempo de exposição ao tabaco podem levar a

redução dessa resposta (Agius et al., 1998).

Os dados encontrados na literatura sobre os efeitos do tabagismo sobre o TMC nasal são controversos. O prolongamento significativo do STT (35% a 120%) tem sido reportado em estudos com tabagistas crônicos (Stanley et al., 1986; Karaman e Tek, 2009; Piotrowska et al., 2010; Ramos et al., 2011), assim como estudos que não encontraram diferenças significativas do STT entre tabagistas e não tabagistas (Littlejohn et al., 1992) e entre tabagistas com maior ou menor carga tabágica (Mahakit e Pumhirun, 1995). Na maioria desses estudos os tabagistas apresentam idade superior a 40 anos e as comorbidades não são totalmente esclarecidas.

Ao avaliarem a frequência do batimento ciliar por meio de biópsia nasal, Zhou et al. (2009) encontraram aumento de 10 a 17% da frequência de batimento ciliar em indivíduos não tabagistas expostos à fumaça do cigarro quando comparados a indivíduos não expostos. Os autores relataram que o aumento da frequência do batimento ciliar poderia representar um dos primeiros efeitos fisiológicos da exposição à fumaça do cigarro. Estudos clínicos (Stanley et al., 1986; Karaman e Tek, 2009) avaliaram o TMC nasal de tabagistas e encontraram um prolongamento significativo do STT quando comparados com indivíduos não tabagistas. A redução do número de células ciliadas e/ou alterações das propriedades viscoelásticas do muco foram apontadas como possíveis explicações para o prolongamento do TMC nasal nesses indivíduos. Mahakit e Punhirun (1995) encontraram diferença significativa do STT entre não tabagistas e tabagistas, porém não

encontraram diferença ao avaliarem o tempo de tabagismo, menor ou igual a cinco anos de tabagismo como também não encontraram diferenças quando compararam o número de cigarros fumados por dia, menos ou mais de 20 cigarros por dia. Em análise realizada em nosso estudo comparando o tempo de tabagismo, menor que cinco anos e igual ou maior que cinco anos, encontramos diferenças significativas nos valores de STT, sendo que os voluntários com maior tempo de tabagismo apresentaram os valores de STT mais acelerados quando comparados com os voluntários com menor tempo (dados não apresentados). Piotrowska et al. (2010) encontraram correlação positiva entre o STT e o consumo diário de cigarros e observaram que pacientes tabagistas com diagnóstico de DPOC apresentaram TMC nasal prolongado (16,3 ± 1,6 minutos) quando comparados a indivíduos não tabagistas (9,9 ± 0,5 minutos) e quando comparados a ex-tabagistas (11,2 ± 0,5 minutos).

Outras condições como o envelhecimento e patologias associadas podem influenciar o TMC nasal. Estudo de Ho et al. (2001) mostrou que o envelhecimento em indivíduos saudáveis está associado à redução da frequência do batimento ciliar e prolongamento do TMC nasal e que essa alteração foi significativa em indivíduos com idade superior a 40 anos. O envelhecimento, o diabetes mellitus (DM) e/ou a hipertensão arterial sistêmica (HAS) são fatores de risco independentes para o prolongamento do TMC nasal (Oliveira-Maul et al., 2013). Para cada ano que o indivíduo envelhece ocorre um aumento de 2% nos valores do STT e quando o DM e/ou a HAS estão associados o risco para o prolongamento do STT é 2,6

vezes maior.

Em estudo que avaliou o efeito da cessação do tabagismo sobre o TMC nasal, Ramos et al. (2011) mostraram que após 15 dias de cessação do hábito tabágico até 180 dias de acompanhamento houve uma redução dos valores do STT, sugerindo uma melhora da efetividade do TMC após a cessação do tabagismo. Na tabela 5 mostramos os valores de STT encontrados na literatura de indivíduos não tabagistas e tabagistas.

Tabela 5. Resultados de estudos de transporte mucociliar nasal por meio do teste de trânsito da sacarina em indivíduos não tabagistas e tabagistas (adaptado com permissão de Nakagawa et al., 2006)

Autores	Nº de indivíduos	Idade (anos)	Valor do STT (minutos)	
Stanley et al., 1986	27	19-66	Não tabagistas	11,1 ± 3,8
	29	19-45	Tabagistas	20,8 ± 9,3
Littlejohn et al., 1992	10	>18	Tabagistas	11,7 ± 3,3
Alfaro-Monge e Soda-Merhy, 1995	50	-	Não tabagistas	10,3
	50		Tabagistas	13,6
Mahakit e Punhirun, 1995	40	14-68	Não tabagistas	12,01
	40	18-57	Tabagistas	15,5
Nakagawa et al., 2005	8	32 ± 14	Não tabagistas	10,5
	8	32 ± 14	Tabagistas	22,0
Karaman e Tek, 2009	20	34 ± 11	Não tabagistas	12,1 ± 1,9
	20	33 ± 13	Tabagistas	26,4 ± 1,8
Piotrowska et al., 2010	21	59 ± 9	Não tabagistas	9,9 ± 0,5
	13	-	Tabagistas	16,3 ± 1,6
Ramos et al., 2011	33	52 ± 14	Não tabagistas	7 (6-13)
	33	49 ± 12	Tabagistas	14 (8-26)
Habesoglu et al., 2012	15	28 ± 11	Não tabagistas	6,4 ± 1,6
	17	28 ± 11	Tabagistas	23,6 ± 12,4

O aumento na produção e as alterações das propriedades físicas do muco estão associados à deficiência do TMC nasal em tabagistas e podem

predispor os indivíduos a condições patológicas (Prescott et al., 1995; Nakagawa et al., 2005; Button et al., 2013; Oliveira-Maul et al., 2013) devido ao maior tempo de contato de microorganismos com o epitélio respiratório.

No nosso estudo os jovens tabagistas não apresentaram alteração na propriedade de superfície do muco nasal. Estes resultados são similares a um estudo anterior com jovens tabagistas assintomáticos, que mostrou aumento de 40% do transporte de secreções pelos cílios e transportabilidade por alto fluxo idêntico ao muco de não tabagistas (Rubin et al., 1992). No entanto, um estudo que avaliou os efeitos da exposição ao condensado da fumaça do cigarro em cultura de células do epitélio nasal de humanos observou que o muco é transportado de forma ineficiente devido a redução da secreção de Cl^-, o que leva a redução do volume do fluido periciliar, alteração do TMC e consequente alteração do transporte do muco (Virgin et al., 2010).

A inflamação nasal e dos seios nasais são comuns em pacientes com DPOC (Kim e Rubin, 2008) e o tabagismo exerce grande efeito sobre o recrutamento de células inflamatórias. Piotrowska et al. (2010) não encontraram diferença na porcentagem de células em LN entre pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis, porém encontraram uma tendência a maior número de linfócitos nos pacientes com DPOC. Para Hadar et al. (2009) as principais alterações histológicas encontradas entre tabagistas e não tabagistas são principalmente o maior número de células caliciformes e aumento da espessura do epitélio respiratório. Em lavado broncoalveolar de indivíduos tabagistas, Karimi et al. (2012) encontraram correlação

significativa entre a carga tabágica e o número de células totais no lavado broncoalveolar assim como maior número de macrófagos, linfócitos e neutrófilos quando comparados com indivíduos não tabagistas e ex-tabagistas. Nós utilizamos o LN para avaliar a inflamação das vias aéreas superiores por meio da contagem total e diferencial de células e pela concentração de citocinas que são moduladoras da inflamação nas vias aéreas (Amin et al., 2003). Nós encontramos no nosso estudo aumento no número de células totais no LN de jovens tabagistas quando comparados aos JNT e aumento do número de macrófagos, células ciliadas e caliciformes em LN de JT<2,5 em comparação aos JNT. Provavelmente, o maior número de células encontradas no lavado nasal possa ser considerado como uma resposta de reparo e/ou de proteção em resposta à exposição aos produtos do cigarro como fundamentado por Gaworski et al. (1998) em seu trabalho com cultura de células nasais de ratos sob ação de fumaça do cigarro.

Em nosso estudo encontramos maior concentração de MPO no LN em JT<2,5 em comparação aos JNT, no entanto não encontramos diferenças significativas na concentração de outros mediadores inflamatórios. A MPO é produzida principalmente pelos neutrófilos e macrófagos que são ativados em resposta ao processo inflamatório. O tabagismo aumenta o número e a atividade dos neutrófilos, macrófagos e eosinófilos aumentando a liberação de mediadores inflamatórios (Floreani e Rennard, 1999). Em tabagistas que não apresentaram sintomas graves em vias aéreas, Andelid et al. (2007) encontraram em amostras de sangue

periférico maior concentração de MPO e o consideraram como um marcador de inflamação sistêmica. Hurst et al. (2006) encontraram aumentos significativos nas concentrações de IL-6 e MPO em lavado nasal e nas concentrações de MPO em escarro induzido em pacientes com DPOC exacerbado comparado com pacientes com DPOC estável. Porém não encontraram associação entre inflamação das vias aéreas e inflamação sistêmica.

Pesci et al. (1998) encontraram maior número de células inflamatórias como também maior concentração de IL-8 e MPO em lavado brônquico de tabagistas com diagnóstico de DPOC quando comparados com indivíduos não tabagistas e encontraram correlação significativa entre os mediadores inflamatórios, que são capazes de danificar o epitélio brônquico. Outro método utilizado em nosso estudo para auxiliar na avaliação da inflamação das vias aéreas superiores e inferiores foi o pH do EBC (Tanou et al., 2009; Papaioannou et al., 2010). A análise do pH do EBC é de baixo custo e pode auxiliar no entendimento da patofisiologia de doenças respiratórias (Kostikas et al., 2002) além de ser um método não invasivo e reprodutível (Vaughan et al., 2003), porém pode apresentar limitações metodológicas que interferem em seu uso clínico (Horváth et al., 2005).

O EBC contém biomarcadores de estresse oxidativo e de inflamação como o peróxido de hidrogênio, os isoprostanos e as citocinas, sendo que as concentrações destes biomarcadores são influenciadas pelas doenças respiratórias e pelas intervenções terapêuticas (Horváth et al., 2005; Hoffmeyer et al., 2009). A faixa de valores de pH do EBC em indivíduos não

tabagistas é de 7,80 a 8,20 (Koczulla et al., 2009; Koczulla et al., 2010; Lin et al., 2011; MacNee et al., 2011). Valores inferiores refletem acidificação do fluido de revestimento do epitélio respiratório (Paget-Brown et al., 2006), como também podem refletir a inflamação nas vias aéreas inferiores devido ao estresse oxidativo com liberação de amônia, um agente irritativo para as vias aéreas e liberação de mediadores inflamatórios em resposta aos produtos do cigarro (van der Vaart et al., 2004; Koczulla et al., 2010; Papaioannou et al., 2010). Estudos mostram que tabagistas assintomáticos apresentam redução significativa do pH do EBC quando comparados com não tabagistas saudáveis (Hoffmeyer et al., 2009; Koczulla et al., 2010). No nosso estudo, nós mostramos que os JT≥2,5 apresentaram valores menores do pH do EBC quando comparados aos JT<2,5 e com os JNT e que essa redução está associada com a carga tabágica. Tabagistas com maior carga tabágica (superior a 10 anos-maço) apresentaram maior redução nos valores do pH do EBC (7,40), valor semelhante encontrado em pacientes com DPOC estável (7,36), nos casos de pacientes com DPOC exacerbada os valores encontrados são cerca de 7,05 (Koczulla et al., 2010).

Na tabela 6 mostramos os valores de pH do EBC encontrados na literatura em indivíduos não tabagistas, tabagistas e indivíduos com doenças respiratórias.

Tabela 6. Resultados de estudos de potencial hidrogeniônico (pH) de condensado do ar exalado em indivíduos não tabagistas e tabagistas e em doenças respiratórias (com permissão de Lima et al., 2013)

Autores	Aparelho	Idade (anos)	Valor do pH	
Kostikas et al., 2002	Manufaturado	34 ± 8	Não tabagistas	7,57 (7,51–7,64)
		31 ± 6	Asma	7,43 (7,35–7,52)
		32 ± 9	Bronquiectasia	7,11 (7,04–7,19)
		54 ± 8	DPOC	7,16 (7,09–7,23)
Koczulla et al., 2009	ECoScreen	34 ± 2	Não tabagistas	8,27 ± 0,19
		61 ± 5	DPOC	7,97 ± 0,48
		25 ± 6	Asma	8,20 ± 0,2
		30 ± 6	Gripe	7,56 ± 0,77
Hoffmeyer et al., 2009	ECoScreen	18-60	Não tabagistas	7,59 (7,28-7,73)
		20-56	Tabagistas	7,14 (5,70-7,43)
Koczulla et al., 2010	R-Tube	32 ± 10	Não tabagistas	8,16 (0,22)
		38 ± 12	Tabagistas	7,40 (2,26)
		68 ± 8	DPOC estável	7,36 (1,10)
		69 ± 12	DPOC exacerbado	7,05 (2,70)
Papaioannou et al., 2010	ECoScreen	65 ± 7	Tabagistas	7,24 (7,09-7,54)
		65 ± 10	DPOC	7,21 (7,02-7,44)
		62 ± 10	Tabagistas+DPOC	7,50 (7,40-7,66)
		68 ± 9	Ex-tabagistas+DPOC	7,16 (6,89-7,36)
Lin et al., 2011	Manufaturado	22 ± 1	Não tabagistas	7,98 ± 0,08
		38 ± 10	DPOC	5,81 ± 0,51
MacNee et al., 2011	R-Tube	58 ± 9	Não tabagistas	7,59 ± 0,44
		58 ± 9	Tabagistas	7,18 ± 0,85
		63 ± 7	DPOC	7,29 ± 0,60

Em nosso estudo os JT assintomáticos não apresentaram alteração da função pulmonar, possivelmente as alterações precoces que ocorrem nas vias aéreas não são detectadas pela espirometria.

Estudo de van Schayck et al. (2002) mostrou que o envelhecimento e sintomas como a tosse crônica aumentam o risco de indivíduos tabagistas desenvolverem obstrução brônquica, com prevalência de 15% entre 35 e 40 anos chegando a 50% na faixa etária de 61 a 70 anos. A presença de

sintomas como tosse crônica e o aumento da produção de muco podem auxiliar na identificação de indivíduos em risco para desenvolver DPOC (de Marco et al., 2007). Cerveri et al. (2003) encontraram maior prevalência de tosse crônica e hipersecreção em adultos jovens do sexo masculino com idade entre 22 e 40 anos. Em nosso estudo os JT≥2,5 apresentaram maior queixa sobre tosse e secreção nasal escorrendo para a garganta quando comparados aos JNT e JT<2,5. Em estudo de Piotrowska et al. (2010), pacientes com diagnóstico de DPOC apresentaram queixas similares ao nosso estudo, aproximadamente 92% apresentaram queixa de tosse e cerca de 80% apresentaram queixa de secreção nasal escorrendo para a garganta e nariz escorrendo.

Brevemente, sabe-se que a cessação do tabagismo é a estratégia indicada para a redução de sintomas respiratórios, a redução da inflamação das vias aéreas e a melhora da função pulmonar. Estudos em indivíduos com idade média de 40 anos relatam que em três meses de cessação ocorre redução da presença (Eagan et al., 2004) e da gravidade (Stein et al., 2005) de sintomas respiratórios. Em pacientes com média de idade de 50 anos, os principais benefícios da cessação do tabagismo são relatados em um ano de cessação como melhora do VEF_1 (Scanlon et al., 2000), redução da metaplasia de células caliciformes e redução da quantidade de muco comparados aos indivíduos tabagistas (Swan et al., 1992) e redução da inflamação nas vias aéreas em tabagistas assintomáticos (Willemse et al., 2005).

Nós mostramos em nosso estudo que o tabagismo causa alterações

funcionais e inflamatórias em jovens tabagistas assintomáticos e que essas alterações estão associadas à carga tabágica. Dessa forma, nossos resultados podem contribuir no entendimento dos efeitos precoces do tabagismo em jovens assim como auxiliar na fundamentação da cessação do tabagismo em jovens assintomáticos.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusões

Os resultados do nosso estudo permitem concluir que:

1) Tabagistas assintomáticos com idade igual ou inferior a 35 anos apresentam alterações do transporte mucociliar nasal, inflamação nasal e inflamação de vias aéreas inferiores comparados com jovens não tabagistas de mesma faixa etária e

2) Há associação entre carga tabágica e inflamação em vias aéreas inferiores nos jovens com idade igual ou inferior a 35 anos.

7. REFERÊNCIAS

7. Referências bibliográficas

1. Agius AM, Smallman LA, Pahor AL. Age, smoking and nasal ciliary beat frequency. Clin Otolaryngol. 1998;23(3):227-230.
2. Alfaro-Monge JM, Soda-Merhy A. The comparative test of nasal mucociliary function in healthy subjects, smokers and non-smokers. Acta Otorrinolaringol Esp. 1995;46(3):187-189.
3. Amin K, Ekberg-Jansson A, Löfdahl C-G, Venge P. Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. Thorax. 2003;58(2):135-142.
4. Andelid A, Bake B, Rak S, Lindén A, Rosengren A, Ekberg-Jansson A. Myeloperoxidase as a marker of increasing systemic inflammation in smokers without severe airway symptoms. Respir Med. 2007;101(5):888-895.
5. Antunes MB, Cohen NA. Mucociliary clearance – a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2007;7(1):5-10.
6. Araújo AJ de, Menezes AMB, Dórea AJPS, Torres BS, Viegas CA de A, Silva CAR, et al. Diretrizes para cessação do tabagismo. J Brasil Pneumol. 2004;30(2):1-76.
7. Belda J, Parameswaran K, Keith PK, Hargreave FE: Repeatability and validity of cell and fluid-phase measurements in nasal fluid: a comparison of two methods of nasal lavage. Clin Exp Allerg. 2001;31(7):1111-1115.
8. Bezerra TFP, Piccirillo JF, Fornazieri MA, Pilan RRM, Abdo TGT, Pinna FR, Padua FGM, Voegels RL. Cross-cultural adaptation and validation of SNOT-20 in portuguese. Int J Otolaryngol. 2011. doi: 10.1155/2011/306529.
9. Bronte-Stewart B. Cigarette smoking and ischemic heart disease. Br Med J. 1961;1(5223):379-384.
10. Button B, Okada SF, Frederick CB, Thelin WR, Boucher RC. Mechanosensitive ATP release maintains proper mucus hydration of airways. Sci Signal. 2013;6(279):ra46.
11. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O,

Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. Eur Respir J. 2003;21(4):589-593.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Smoking-Attributable Mortality, Years of Potential Life Lost, and Productivity Losses - United States, 2000-2004. Morbidity Mortality Weekly Report. 2008;57(45):1226-1228.
13. Cerveri I, Accordini S, Verlato G, Corsico A, Zoya MC, Casali L, Burney P, de Marco R for the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) Study Group. Variations in the prevalence across countries of chronic bronchitis and smoking habits in young adults. Eur Respir J. 2001;18(1):85-92.
14. Cerveri I, Accordini S, Corsico A, Zoya MC, Carrozi L, Cazzoletti L, Beccaria M, Marinoni A, Viegi G, de Marco R for the ISAYA Study Group. Chronic cough and phlegm in young adults. Eur Respir J. 2003;22(3):413-417.
15. Comandini A, Rogliani P, Nunziata A, Cazzola M, Curradi G, Saltini C. Biomarkers of lung damage associates with tobacco smoke in induced sputum. Respir Med. 2009;103(11):1592-1613.
16. Correa PCRP, Barreto SM, Passos VMA. Smoking-attributable mortality and years of potential life lost in 16 Brazilian capitals, 2003: a prevalence-based study. BMC Public Health. 2009;9:206.
17. de Lima TM, Kazama CM, Koczulla AR, Hiemstra PS, Macchione M, Fernandes ALG, Santos UP, Bueno-Garcia ML, Zanetta DM, de André CDS, Saldiva PHN, Nakagawa NK. pH in exhaled breath condensate and nasal lavage as a biomarker of air pollution-related inflammation in street traffic-controllers and office-workers. Clinics. 2013;68(12):1488-1499.
18. de Marco R, Accordini S, Cerveri I, Corsico A, Antó JM, Künzli N, Janson C, Sunyer J, Jarvis D, Chinn S, Vermeire P, Syanes C, Ackermann-Liebrich U, Gislason T, Heinrich J, Leynaert B, Neukirch F, Schouten JP, Wjst M, Burney P. Incidence of chronic obstructive pulmonary disease in a cohort of young adults according to the presence of chronic cough and phlegm. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(1):32-39.

19. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. Br Med J. 1950;2(4682):739-748.
20. Dube MF, Green CR. Methods of collection of smoke for analytical purposes. Recent Adv Tob Sci. 1982;8:42-102.
21. Dye JA, Adler KB. Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. Thorax. 1994;49(8):825-834.
22. Eagan TML, Gulsvik A, Eide GE, Bakke PS. Remission of respiratory symptoms by smoking and occupation exposure in a cohort study. Eur Respir J. 2004; 23(4):589-594.
23. Edwards JH. Contribution of cigarette smoking to respiratory disease. Br J Prev Soc Med. 1957;11(1):10-21.
24. European Community Respiratory Health Survey Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). Eur Respir J. 1996;9(4):687-695.
25. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. Lancet. 2003;362(9387):847-852.
26. Flanders WD, Lally CA, Zhu BP, Henley SJ, Thun MJ. Lung cancer mortality in relation to age, duration of smoking, and daily cigarette consumption: results from Cancer Prevention Study II. Cancer Res. 2003;63(19):6556-6562.
27. Floreani AA, Rennard SI. The role of cigarette smoke in the pathogenesis of asthma and as a trigger for acute symptoms. Curr Opin Pulm Med. 1999;5(1):38-46.
28. Gaworski CL, Dozier MM, Eldridge SR, Morrisey R, Rajendran N, Gerhart JM. Cigarette smoke vapor-phase effects in the rat upper respiratory tract. Inhal Toxicol. 1998;10(9):857-873.
29. 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.
30. 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.
31. Habesoglu M, Demir K, Yumusakhuylu AC, Yilmaz AS, Oysu C. Does passive smoking have an effect on nasal mucociliary clearance? Otolaryngol Head Neck Surg. 2012;147(1):152-156.
32. 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.
33. Haswell LE, Hewitt K, Thorne D, Richter A, Gaça MD. Ciagrette smoke total particulate matter increases mucous secreting cell numbers in vitro: a potencial model of goblet cell hyperplasia. Toxicol in Vitro. 2010;24(3):981-987.
34. Hills BA. Gastric mucosal barrier: Stabilization of hydrophobic lining to the stomach by mucus. J Appl Physiol. 1985;19(3 Pt 1):342-349.
35. Ho JC, Chan KN, Hu WH, Lam WK, Zheng L, Tipoe GL, Sun J, Leung R, Tsang KW. The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia. Am J Respir Care Med. 2001;163(4):983-988.
36. Hoffmeyer F, Harth V, Bunger J, Bruning T, Raulf-Heimsoth M. Leukotriene B_4, 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$, and pH in exhaled breath condensate from asymptomatic smokers. J Physiol Pharmacol. 2009;60(Suppl 5):57-60.
37. Hortense FTP, Carmagnani MIS, Brêtas ACP. O significado do tabagismo no contexto do câncer de laringe. Rev Bras Enferm. 2008;61(1):24-30.
38. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. Eur Respir J. 2005;26(3):523-548.
39. Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TMA, Donaldson GC, Wedzicha JA. Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173(1):71-78.
40. Junqueira LC, Carneiro J. Aparelho Respiratório. In: Histologia Básica.

Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 339-358.
41. 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.
42. Karimi R, Tornling G, Grunewald J, Eklund A, Sköld CM. Cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid in smokers is dependent on cumulative smoking history. Plos One. 2012;7(3):e34232.
43. Kim JS, Rubin BK. Nasal and sinus involvement in chronic obstructive pulmonary disease. Curr Opin Pulm Med. 2008;14(2):101-104.
44. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. J Clin Invest. 2002;109(5):571-577.
45. Koczulla R, Noeske S, Herr C, Jörres RA, Römmelt H, Vogelmeier C, Bals R. Acute and chronic effects of smoking on inflammation markers in exhaled breath condensate in current smokers. Respiration. 2010;79(1):61-67.
46. Koczulla R, Dragonieri S, Schot R, Bals R, Gauw SA, Vogelmeier C, Rabe KF, Sterk PJ, Hiemstra PS. Comparison of exhaled breath condensate pH using two commercially available devices in healthy controls, asthma and CPOD patients. Respir Res. 2009;10:78.
47. Konrad F, Schiener R, Marx T, Georgieff M. Utrastructure and mucociliary transport of bronchial respiratory epithelium in intubated patients. Intensive Care Med. 1995;21(6):482-489.
48. Kostikas K, Papatheodorou G, ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165(1):1364-1370.
49. Kreindler JL, Jackson AD, Kemp PA, Bridges RJ, Danahay H. Inhibition of chloride secretion in human bronchial epithelial cells by cigarette smoke extract. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005;288(5):894-902.
50. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Doenças do Sistema Imunológico. In: Robbins, Patologia Básica. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 115-186.
51. 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):e8157.
52. Lin JL, Bonnichsen MH, Thomas PS. Standardization of exhaled breath condensate: effects of different de-aeration protocols on pH and H_2O_2 concentrations. J Breath Res. 2011. doi: 10.1088/1752-7155/5/1/011001.
53. Littlejohn MC, Hokanson JA, Quinn FB Jr, Bailey BJ. The relationship between the nasal cycle and mucociliary clearance. Laryngoscope. 1992;102(2):117-120.
54. MacNee W, Rennard SI, Hunt JF, Edwards LD, Miller BE, Locantore NW, Tal-Singer R. Evaluation of exhaled breath condensate pH as a biomarker for COPD. Respir Med. 2011;105(7):1037-1045.
55. Mahakit P, Pumhirun P. A preliminary study of nasal mucociliary clearance in smokers, sinusitis and allergic rhinitis patients. Asian Pac J Allergy Immunol. 1995;13(2):119-121.
56. Meyer KC. Lung infections and aging. Ageing Res Rev. 2004;3(1):55-67.
57. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, et al. General considerations for lung function testing. Eur Respir J. 2005;26(1):153-161.
58. Mullen JBM, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Structure of central airways in current smokers and ex-smokers with and without mucus hypersecretion: relationship to lunf function. Thorax. 1987;42(11):843-848.
59. Naclerio RM, Meier HL, Kagey-Sobotka A, Adkinson NF Jr, Meyer DA, Norman OS, Lichtenstein LM. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. Am Rev Respir Dis. 1983;128(4):597-602.
60. Nakagawa NK. Estudo dos efeitos de sistemas de umidificação em pacientes ventilados mecanicamente sobre as propriedades físicas do muco respiratório e sua transportabilidade por cílio e de tosse [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 1997.
61. Nakagawa NK, Franchini ML, Driusso P, oliveira LR, Saldiva PH, Lorenzi G. Mucociliary clerance is impaired in acutely ill patients. Chest. 2005;128(5):2772-2777.

62. 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.
63. 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 Ther. 2010;5(5):34-38.
64. Navarrette CR, Sisson JH, Nance E, Allen-Gipson D, Hanes J, Wyatt TA. Particulate matter in cigarette smoke increases ciliary axoneme beating through mechanical stimulation. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. 2012;25(3):159-168.
65. Oliveira-Maul JP, Carvalho HB, Goto DM, Maia RM, Fló C, Barnabé 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):1091-1097.
66. Opaleye ES, Sanchez ZM, de Moura YG, Galduróz JCF, Locatelli DP, Noto AR. The Brazilian smoker: a survey in the largest cities of Brazil. Rev Bras Psiquiatr. 2012;34:43-51.
67. Organização Mundial da Saúde. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – Décima Revisão- (CID 10). Traduzido pela Faculdade de Saúde Pública de São Paulo - Centro Colaborador da OMS para Classificação de Doenças em Português. 4a ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1997.
68. Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A, Bunyan D, Hom S, Nguyen A, Hunt JF. Normative data for pH of exhaled breath condensate. Chest. 2006;129(2):426-430.
69. Papaioannou AI, Koutsokera A, Tanou K, Kiropoulos TS, Tsilioni I, Oikonomidi S, Liadaki K, Pournaras S, Gourgoulianis KI, Kostikas K. The acute effect of smoking in healthy and asthmatic smokers. Eur J Clin Invest. 2010;40(2):103-109.
70. Parkes G, Greenhalgh T, Griffin M, Dent R. Effect on smoking quit rate of telling patients their lung age: the Step2quit randomised controlled trial. BMJ.

2008;336(7644):598-600.
71. Peden DB. The use of nasal lavage for objective measurement of irritant induced nasal inflammation. Regul Toxicol Pharmacol. 1996;24(1 Pt 2):76-78.
72. Pereira CAC, Sato T, Rodrigues SC. New reference values for forced espirometry in white adults in Brazil. J Bras Pneumol. 2007;33(4):397-406.
73. Pesci A, Balbi B, Majori M, Gacciani G, Bertacco S, Alciato P, Donner CF. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 1998;12(2):380-386.
74. Piccirillo JF, Merritt-Jr MG, Richards ML. Psychometric and clinimetric validity of the 20-item SinoNasal Outcome Test (SNOT-20). Otolaryngol Head Neck Surg. 2002;126(1):41-47.
75. Piotrowska VM, Piotrowski WJ, Kumanowska Z, Marczak J, Górski P, Antczak A. Rhinosinusitis in COPD: symptoms, mucosal changes, nasal lavage cells and eicosanoids. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2010;5:107-117.
76. Planeta CS, Cruz FC. Bases neurofisiológicas da dependência do tabaco. Rev Psiq Clin. 2005;32(5):251-258.
77. Planeta CS, DeLucia R. Farmacodependência. In: DeLucia R, Oliveira-Filho RM, editores. Farmacologia Integrada. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. p. 277-288.
78. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonar infection. Eur Respir J. 1995;8(8):1333-1338.
79. Pinto M, Ugá MAD. Os custos de doenças tabaco-relacionadas para o Sistema Único de Saúde. Cad. Saúde Pública. 2010; 26(6):1234-1245.
80. Puchelle E, Aug F, Pham QT, Bertrand A. Comparison of three methods for measuring nasal mucociliary clearance in man. Acta Otolaryngol. 1981;91(3-4):297-303.
81. Puchelle E, Zahm JM, Jacquot J, Plotkowski C, Duvivier C. A simple technique for measuring adhesion properties of human bronchial secretions. Eur J Resp Dis. 1987;71:281-282.
82. Ramos EM, Toledo AC, Xavier RF, Foso LC, Vieira RP, Ramos D,

Jardim JR. Reversibility of impaired nasal mucociliary clearance in smokers following a smoking cessation programme. Respirology. 2011;16(5):849-855.
83. Ribeiro M, Angelini R, Robles-Ribeiro PG, Sterlmach R, Santos U de P, Terra-Filho M. Validation of the Brazilian-Portuguese version of the European Community Respiratory Health Survey in asthma patients. J Asthma. 2007;44(5):371-375.
84. 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(3):545-547.
85. Saetta M, Finkelstein R, Cosio MG. Morphological and cellular basis for airflow limitation in smokers. Eur Respir J. 1994;7(8):1505-1515.
86. Sayiner A, Hague C, Ailan A, Leipsicb J, Wierenga L, Krowchuk NM, Ceylan N, Sayiner A, Sin DD, Coxson HO. Bronchiolitis in young female smokers. Respir Med. 2013;107(5):732-738.
87. Simet SM, Sisson JH, Pavlik JA, DeVasure JM, Boyen C, Liu X, Kawasaki S, Sharp JG, Rennard SI, Wyatt TA. Long-term cigarette smoke exposure in a mouse model of ciliated epithelial cell function. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010;43(6):635-640.
88. Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, Tashkin DP, for the Lung Health Study Group. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease: The Lung Health Study. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161(2 Pt 1):381-390.
89. Stanley PJ, Wilson R, Greenstone MA, Macwilliam L, Col PJ. Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. Thorax. 1986;41(7):519-523.
90. Stavrides, JC. Lung carcinogenesis: pivotal role of metals in tobacco smoke. Free Radic Biol Med. 2006;41(7):1017-1030.
91. Stein MD, Weinstock MC, Herman DS, Anderson BJ. Respiratory symptom relief related to reduction in cigarette use. J Gen Intern Med. 2005; 20(10):889-894.
92. 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.

93. Tanou K, Koutsokera A, Kiropoulos TS, Maniati M, Papaioannou AI, Georga K, Zarogiannis S, Gourgoulianis KI, Kostikas K. Inflammatory and oxidative stress biomarkers in allergic rhinitis: the effects of smoking. Clin Exper Allergy. 2009;39(3):345-353.

94. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. Thorax. 2004;59(8):713-721.

95. van Schayck CP, Loozen JM, Wagena E, Akkermans RP, Wesseling GJ. Detecting patients at a high risk of developing chronic obstructive pulmonary disease in general practice: cross sectional case finding study. BMJ. 2002;324(7350):1370.

96. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Turner R, Nguyen T-A, Smith A, Urban P, Hom S, Gaston B, Hunt J. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. Eur Respir J. 2003;22(6):889-894.

97. Viana GF de S, Garcia KS, Menezes-Filho JA. Assessment of carcinogenic heavy metal levels in Brazilian cigarettes. Environ Monit Assess. 2011;181(1-4):255-265.

98. 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.

99. Willemse BWM, Ten Hacken NHT, Rutgers B, Lesman-Leegte IGAT, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. Eur Respir J. 2005;26(5):835-845.

100. World Health Organization. WHO report on the Global Tobacco Epidemic, 2008. Geneva: WHO; 2008.

101. World Health Organization. Global Tobacco Surveillance System (GTSS), Global Adult Tobacco Survey (GATS): Indicator Guidelines: Definition and Syntax, 2009. Geneva: WHO; 2009.

102. Zeidel A, Beilin B, Yarden I, Mayburd E, Smirnov G, Bessler H. Immune response in asymptomatic smokers. Acta Anaesthesiol Scand. 2002;46(8):959-964.

103. 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.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/04/2013, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 147/13 intitulado: "EFEITOS DO TABAGISMO SOBRE O TRANSPORTE MUCOCILIAR NASAL, PROPRIEDADES FÍSICAS DO MUCO, PH DO CONDENSADO DO AR EXALADO, PH, CELULARIDADE, CITOCINAS E PROTEÔMICA EM LAVADO NASAL " 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 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Naomi Kondo Nakagawa
Pesquisador (a) Executante: Marina Lazzari Nicola

CEP-FMUSP, 29 de Abril de 2013.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

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

Anexo 2. 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 sobre o transporte mucociliar nasal, propriedades físicas do muco, pH do condensado do ar exalado, pH, celularidade, citocinas e proteômica em lavado nasal

2. PESQUISADORES: FT. Marina Lazzari Nicola e DRA. Naomi Kondo Nakagawa.
CARGO/FUNÇÃO: FISIOTERAPEUTA E PROFESSORA DE FISIOTERAPIA (respectivamente)
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CREFITO 145633-F e CREFITO 5076-F
UNIDADE DO HCFMUSP: LABORATÓRIO DE POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA EXPERIMENTAL FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA**:**
RISCO MÍNIMO**X** RISCO MÉDIO □
RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : abril de 2013 a abril 2015.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – O presente projeto avaliará: (a) o TMC nasal por meio do teste de sacarina, (b) as propriedades físicas do muco por meio de ângulo de contato e transportabilidade por tosse, (c) pH, celularidade total e diferencial, citocinas e proteômica em LN e (d) o pH em condensado do ar exalado em pacientes tabagistas, não-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, oximetria de pulso, 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.
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 praticamente inexistentes, as avaliações já foram utilizadas em crianças, jovens, idosos e inclusive em pacientes gravemente enfermos. Além disto, 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 que será realizada por um especialista, o(a) sr(a). poderá sentir um pouco de dor no local da punção da agulha.
5 – Não há benefício direto para o(a) Sr(a). Os resultados desse estudo poderão contribuir no entendimento dos efeitos do hábito de fumar 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. Marina Lazzari Nicola 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 987610175 (Dra. Marina) E-mail: marinanicola@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 há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
11. 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 SOBRE O

TRANSPORTE MUCOCILIAR NASAL, PROPRIEDADES FÍSICAS DO MUCO, PH DO CONDENSADO DO AR EXALADO, PH, CELULARIDADE, CITOCINAS E PROTEÔMICA EM LAVADO NASAL".
Eu discuti com a Dra. Marina Lazzari Nicola 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.

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 3. Questionário *European Community Respiratory Health Sourvey – ECRS Screening Questionnaire*

Para responder a estas questões, por favor, escolha a resposta apropriada e se você não estiver com certeza, por favor, responda "não".

1. Você teve chiado ou aperto no peito alguma vez nos últimos 12 meses? Se a resposta for "não", vá para a questão 2. Se "sim"

1.1 Quando você teve chiado, sentiu falta de ar junto?

1.2 Quando você teve falta de ar, sibilos (chiado no peito) estavam sempre presentes?

1.3 Você teve chiado e sibilos (chiado no peito) mesmo quando não estava resfriado?

2. Você acordou com a sensação de aperto no peito alguma vez nos últimos 12 meses?

3. Você acordou por causa de uma crise de falta de ar nos últimos 12 meses?

4. Você acordou por causa de uma crise de tosse nos últimos 12 meses?

5. Você teve uma crise de asma nos últimos 12 meses?

6. Você esta usando no momento algum medicamento (incluindo inalações, bombinhas ou comprimidos) para asma?

7. Você tem alguma alergia no nariz incluindo rinite alérgica a flores?

8. Qual é a sua data de nascimento?

9. Qual é a data de hoje?

10. Seu sexo é masculino ou feminino?

Anexo 4. Questionário de informações gerais sobre a saúde

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO INDIVÍDUO DA PESQUISA

Nome: _____ Identificação: _____
RG: _____ DN: ____/____/____ Idade: _____ Altura: _____ Peso:_____
Endereço: _____
Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____
Telefone: (__) _____ Celular: (__) _____ Estado civil: _____
Grau de escolaridade: _____ Profissão: _____
Local de trabalho: _____
Moradia: alvenaria ( ) outros _____
Animais dentro de casa: ( ) gato ( ) cachorro ( ) aves ( ) roedores ( ) outros: _____
HAS ( ) medicamentos: _____ Quanto tempo: _____
DM ( ) medicamentos: _____ Quanto tempo: _____
DPOC ( ) medicamentos: _____ Quanto tempo: _____
Depressão ( ) medicamentos: _____ Quanto tempo: _____
Outras: _____ Quanto tempo: _____
Internações hospitalares prévias (Quando? Por quê?): _____
Infecção respiratória: ( ) Não ( ) Sim – Antibiótico: _____ Quando: _____
Tabagista: ( ) Sim ( ) Não Quantos cigarros por dia? _____ Há quantos anos? _____
Dieta (restrições): _____
Faz acompanhamento médico? ( ) Sim ( ) Não Com qual frequência? _____ Local: _____
Segue corretamente a orientação médica? ( ) Sim ( ) Não Machuca-se com frequência: ( ) Sim ( ) Não
Realiza alguma atividade física? ( ) Não ( ) Sim Qual?/Duração: _____
Afastamento do trabalho? ( ) Sim ( ) Não Motivo e tempo: _____

DATA		**OBSERVAÇÃO**
Horário		
STT		
Narina		
PA		
FC		
SpO2		
Tº		
f		
CO exalado		
CO Hb		
Umidade		
Tº Ambiente		
Células Totais		
Ângulo de contato		
pH EBC		

Anexo 5. Questionário SNOT-20

GRUPO DE RINOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA USP
NOME: _____ SEXO: __
RGHC: _____ IDADE: __ TELEFONE: (__) _____ - _____

AVALIAÇÃO DE RESULTADOS NASOSSINUSAIS. (SNOT-20)

Você encontrará abaixo uma lista de sintomas e conseqüências sociais e emocionais da sua rinossinusite. Gostaríamos de saber mais sobre estes problemas e pedimos que respondesse às seguintes perguntas da melhor maneira possível. Não há respostas certas ou erradas e somente você pode nos dar essas informações. Por gentileza, dê uma nota para seus problemas conforme se apresentaram nas duas últimas semanas. Obrigado por sua participação. Caso tenha alguma dúvida, peça a nossa ajuda imediatamente.

1. Considerando a gravidade do problema, quando aparece e a freqüência com que acontece; dê uma nota para cada item abaixo de acordo com o grau de intensidade do problema. Faça um círculo ao redor do número que corresponde ao que você sente. Use a escala ao lado:	Nenhum problema	Problema muito pequeno	Problema pequeno	Problema moderado	Problema sério	Pior problema possível	5 itens mais importantes
1. Necessidade de assoar o nariz	0	1	2	3	4	5	☐
2. Espirros	0	1	2	3	4	5	☐
3. Nariz escorrendo	0	1	2	3	4	5	☐
4. Tosse	0	1	2	3	4	5	☐
5. Secreção nasal escorrendo para a garganta	0	1	2	3	4	5	☐
6. Secreçao nasal grossa	0	1	2	3	4	5	☐
7. Ouvido tampado	0	1	2	3	4	5	☐
8. Tontura	0	1	2	3	4	5	☐
9. Dor de Ouvido	0	1	2	3	4	5	☐
10. Dor/ pressão na face	0	1	2	3	4	5	☐
11. Dificuldade de pegar no sono	0	1	2	3	4	5	☐
12. Acordar durante a noite	0	1	2	3	4	5	☐
13. Falta de uma boa noite de sono	0	1	2	3	4	5	☐
14. Acordar cansado	0	1	2	3	4	5	☐
15. Fadiga	0	1	2	3	4	5	☐
16. Produtividade diminuída	0	1	2	3	4	5	☐
17. Concentração reduzida	0	1	2	3	4	5	☐
18. Frustrado / Inquieto/ Irritado	0	1	2	3	4	5	☐
19. Triste	0	1	2	3	4	5	☐
20. Envergonhado com a doença	0	1	2	3	4	5	☐

2. Favor marcar os itens mais importantes que estão prejudicando sua saúde (máximo de 5 itens)

Bezerra, TFP; Piccirillo, JF; Fornazieri, MA; Pilan, RR de M; Abdo, TRT; Pinna, F de R; Padua, FG de M; Voegels, RV. (2011)