

Marcadores inflamatórios no monitoramento do controle da asma: revisão

Inflammatory biomarkers in asthma management: a review

**Eduardo Costa¹, José Angelo Rizzo¹, Adelmir de Souza Machado¹,
Alfeu T. França¹, Flávio Sano¹, Gustavo F. Wandalsen¹, Marcelo V. Aun¹,
Pedro F. Giavina-Bianchi Jr.¹, João Negreiros Tebyriçá², Dirceu Solé³**

Resumo

Asma brônquica caracteriza-se por sintomas decorrentes da obstrução variável ao fluxo aéreo, hiperresponsividade brônquica a diversos estímulos e inflamação crônica da via aérea.

As formas atuais de classificação da gravidade e do controle da asma não incluem marcadores do processo inflamatório. Nas últimas duas décadas vários métodos têm sido estudados para preencher esta lacuna no manuseio da asma.

O artigo faz uma revisão das evidências atuais em relação à potencial utilização desses métodos no diagnóstico e monitoramento do controle da asma, com especial atenção ao escarro induzido, óxido nítrico no ar expirado e condensado do ar expirado.

É provável que no futuro, com um conjunto destes parâmetros, avaliemos de forma mais completa o controle da asma, analisando de forma direta e não invasiva o processo inflamatório da via aérea.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2011; 34(5):193-202: Asma, marcadores inflamatórios, escarro induzido, óxido nítrico, condensado do ar expirado.

Abstract

Bronchial asthma is defined by symptoms due to variable bronchial obstruction, airway hyperresponsiveness to specific and non-specific stimuli and chronic airway inflammation. Classification of severity and control level of the disease don't take into consideration biomarkers of bronchial inflammation. In the last two decades many methods have been investigated to fulfill this gap in asthma management.

This is a review of evidence about potential utilization of biomarkers in diagnosis of asthma and its control monitoring, with particular focus on induced sputum, fractional exhaled nitric oxide and expired breath condensate.

It's reasonable to believe that in a few years, using some of these methods together, it will be possible to evaluate asthma control in a more complete way, with direct and non-invasive biomarkers of airway inflammation.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2011; 34(5):193-202: Asthma, biomarkers, induced sputum, nitric oxide, expired breath condensate.

Introdução

Asma brônquica resulta da interação complexa entre fatores genéticos e ambientais, sendo ainda influenciada por fatores psicossociais. É definida como doença da via aérea caracterizada por episódios de obstrução brônquica reversível, espontaneamente ou por medicamentos, que se manifesta clinicamente por dispneia, tosse, aperto no peito e sibilância. Apresenta hiperresponsividade das vias aéreas a estímulos alérgicos ou irritativos, associada à inflamação crônica da árvore brônquica, com participação de diversas células, mediadores inflamatórios e interleucinas^{1,2}.

Apesar do crescente conhecimento sobre a imunopatogenia e patofisiologia da asma e o aumento do arsenal terapêutico disponível para seu tratamento, a avaliação de sua gravidade e o monitoramento de sua evolução e resposta ao tratamento, de acordo com as guias nacionais e internacionais, é baseada exclusivamente em parâmetros clínicos. Entre eles temos: frequência de sintomas, uso de medicação de alívio e impacto nas atividades diárias, e funcionais, como as medidas de volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) e de pico de fluxo expiratório

1. Grupo de Assessoria em Asma da Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia (ASBAI).

2. Presidente da ASBAI.

3. Diretor Científico da ASBAI.

(PFE)^{1,2}. Essa avaliação e monitoramento da doença ainda não são completos, visto que não incluem medidas diretas do processo inflamatório brônquico.

A broncoscopia com lavado broncoalveolar e biópsia, considerada o padrão ouro para estudo da inflamação das vias aéreas inferiores, é método invasivo, de custo relativamente alto, sujeito a complicações e não aplicável de forma generalizada na maioria dos asmáticos.

Nos últimos 20 anos, diversas técnicas pouco ou não invasivas vêm sendo estudadas e desenvolvidas para obtenção de medidas diretas do processo inflamatório da árvore brônquica na asma. O método ideal, na asma, seria o mais barato, menos invasivo, tecnicamente mais simples de ser realizado e com melhor reprodutibilidade e correlação com a inflamação brônquica³.

Até o momento ainda não há definição do melhor método, ou conjunto de métodos, para o monitoramento da resposta ao tratamento da asma que tem, como alicerce, a terapêutica anti-inflamatória tópica. Por isso podemos afirmar que nas últimas décadas melhoramos muito o tratamento da doença com o foco no controle da inflamação brônquica, entretanto ainda monitoramos a resposta a esse tratamento com parâmetros indiretos, e não com medidas diretas de redução da inflamação na via aérea.

Esta revisão teve por objetivo rever as evidências científicas recentes relacionadas aos métodos de monitoramento da inflamação brônquica e a sua aplicabilidade no acompanhamento da resposta à terapia anti-inflamatória na asma.

Método

Artigo de revisão baseado em busca bibliográfica no banco de dados PubMed entre 2001 e 2011 utilizando os termos *asthma*, *induced sputum*, *nitric oxide*, *breath condensate* e *biomarkers*.

Resultados e discussão

Foram selecionados artigos de revisão, metanálises, guias e artigos experimentais que continham informações recentes e relevantes e por trazerem novas evidências com potencial de utilização na prática clínica. Também foram incluídos artigos de conhecimento prévio do autor, publicados em período anterior ao da busca, porém necessários à contextualização histórica adequada do assunto.

Escarro induzido

O advento da pandemia de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) e as consequentes pneumopatias por agentes oportunistas reviveu um antigo método de obtenção de secreções das vias aéreas, o escarro induzido (EI). Este consiste na coleta de escarro obtido durante nebulização de solução salina normo ou hipertônica através de um nebulizador ultrassônico⁴. O método permite o diagnóstico etiológico de certas infecções pulmonares como a pneumocistose e a tuberculose, e tem a vantagem de ser bem tolerado e de fácil realização no ambiente ambulatorial.

No início da década de 1990 esse método passou a ser empregado na investigação da inflamação brônquica associada à asma. Pin et al.⁵ foram os primeiros a utilizar a indução do escarro em asmáticos, obtendo material adequado para estudo de células da árvore brônquica em 77% das primeiras tentativas de coleta, aumentando esse índice para 84% após uma segunda indução. Dos 17 asmáticos estudados, apenas um apresentou queda do VEF₁ superior a 20% do valor inicial, as diferenças entre os percentuais de eosinófilos e mastócitos entre sadios e doentes foi semelhante a outros métodos de investigação e a reprodutibilidade das contagens percentuais das diversas células foi satisfatória. Em estudo posterior, Pin et al.⁶ utilizaram o escarro induzido para estudar os efeitos da broncoprovocação específica em pacientes com asma, e observaram aumento da contagem percentual de eosinófilos e mastócitos no escarro, aumento esse relacionado significativamente à redução da PC20 de histamina após a provocação, confirmando, pelo escarro induzido, os achados de outros autores que utilizaram o lavado broncoalveolar (LBA) e a biópsia brônquica com o mesmo objetivo.

A indução do escarro pode ser feita com inalação de solução salina fisiológica ou com salina hipertônica (2% a 4%), o que aumenta a quantidade de escarro produzida. Geralmente é feita em três etapas de 5 a 7 minutos e, em geral, é bem tolerada. A coleta é simples e é fundamental o acompanhamento clínico-funcional (VEF₁ ou PFE) durante o procedimento. Queda igual ou superior a 30% do VEF₁ ou PFE, ou surgimento de sintomas intensos, indicam a suspensão do mesmo. Em nossa experiência, metade dos pacientes com asma leve a moderada apresentou redução \leq 30% do VEF₁, não sendo necessária a interrupção do exame. Pacientes com asma grave podem não tolerar o procedimento até o final, mas mesmo assim costumam fornecer quantidade suficiente de escarro para análise⁷.

O processamento do material obtido requer pessoal treinado e instrumentos adequados (filtros para separação de células escamosas, centrífuga, citocentrífuga, e armazenamento do sobrenadante em temperatura adequada) e deve ser feito em até duas horas após a coleta. Acreditamos que este tem sido o principal empecilho para o uso clínico rotineiro da técnica. Recentemente foram propostas formas mais simples e rápidas de processamento do material para contagem do percentual de eosinófilos que, se devidamente validadas, poderão aumentar a utilização do método na prática clínica⁸.

Alguns estudos foram publicados comparando, nos mesmos pacientes, os resultados de contagens celulares obtidas pelo escarro induzido com outros métodos que dependem da broncoscopia para obtenção de material de vias aéreas inferiores (LBA e biópsia). Enquanto o escarro induzido obtém material predominantemente de grandes e médias vias aéreas, o LBA obtém material de pequenas vias e alvéolos. Por conseguinte, nas amostras de escarro induzido predominam macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, enquanto no LBA predominam macrófagos. Apesar do escarro e o LBA também fornecerem material com linfócitos, a biópsia brônquica é o método mais adequado para obtenção destas células.

Comparando amostras de escarro de asmáticos obtidas por expectoração espontânea e por indução com salina hipertônica, Pizzichini et al.⁹ observaram que as contagens celulares (absoluta e percentual de células inflamatórias) assim como as medidas de triptase e de proteína catiônica eosinofílica (ECP) não foram diferentes com os dois métodos, sugerindo que a solução hipertônica nebulizada não causa alteração na proporção de células inflamatórias e nem ativação de mastócitos e eosinófilos suficiente para gerar alterações naqueles índices bioquímicos medidos. Neste mesmo estudo observaram que as amostras de EI apresentavam maior viabilidade celular e menor contaminação salivar, além de proporcionarem citocentrifugados de melhor qualidade para estudo.

Uma característica indispensável para qualquer método de investigação é a reprodutibilidade das medidas por ele obtidas para as mesmas condições de observação. A habilidade em detectar diferenças entre grupos distintos de doenças e ainda entre subgrupos da mesma doença são fatores que aumentam a utilidade e confirmam a validade do método em questão.

Pizzichini et al.¹⁰ realizaram duas coletas de EI no intervalo de seis dias em asmáticos estáveis (metade deles sintomáticos), controles sadios e fumantes com bronquite não obstrutiva. Além da grande viabilidade celular obtida (média de 83%) e da baixa contaminação salivar (percentual médio de células escamosas = 1,2%), obtiveram ótima reprodutibilidade para as contagens percentuais de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos, e também para as dosagens de ECP, proteína básica principal (MBP), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN), albumina e fibrinogênio. As contagens de número total de células e de percentual de linfócitos não foram reprodutíveis, possivelmente pela grande variabilidade do número total de células em porções distintas de escarro selecionado para processamento e pela dificuldade relatada pelos próprios pesquisadores em identificar com precisão os linfócitos. Concluem eles que o método foi eficaz em demonstrar diferenças significativas entre condições clínicas distintas (sadios, asmáticos e pacientes com bronquite) e entre situações clínicas diferentes da mesma doença, ao demonstrar diferenças no número percentual de eosinófilos e nas concentrações de ECP, MBP, EDN e albumina entre asmáticos sintomáticos e assintomáticos.

Bacci et al.¹¹ avaliaram os possíveis efeitos da própria solução salina hipertônica nebulizada sobre a contagem percentual de células nas vias aéreas e a responsividade brônquica, comparando os achados no escarro obtido através do uso de solução hipertônica (3%, 4% e 5%) e isotônica (0,9%) na nebulização e medindo a responsividade brônquica à metacolina antes e logo após os exames. Os resultados demonstraram que o uso de solução hipertônica não alterou as contagens percentuais de células no escarro, entretanto produziu aumento da responsividade brônquica, o que poderia estar relacionado à maior liberação de mediadores induzida pela solução hipertônica.

Outros autores demonstraram o aumento da concentração de interleucina (IL)-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, RANTES e TNF α (fator de necrose tumoral alfa) no escarro de asmáticos comparado ao de sadios, e dentro do grupo de asmáticos

essas medidas foram significativamente maiores nos pacientes sintomáticos em comparação com os assintomáticos, mostrando mais uma vez a capacidade do método em identificar situações clínicas distintas da asma¹². Keatings e Barnes¹³ demonstraram aumento de marcadores inflamatórios em escarro induzido, marcadores de ativação de neutrófilos e eosinófilos (mieloperoxidase, lipocalina neutrofílica humana, ECP e peroxidase do eosinófilo [EPO]) em asmáticos e em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em comparação com sadios. Observaram também que as proteínas derivadas de neutrófilos estavam mais aumentadas no grupo de DPOC em relação ao grupo de asma, demonstrando mais uma forma de discriminação entre essas doenças através do escarro induzido.

Em relação ao uso do método na avaliação e acompanhamento dos efeitos da corticoterapia na asma, Claman et al.¹⁴ demonstraram redução da concentração de ECP e do percentual de eosinófilos no escarro após administração oral de prednisona durante seis dias, sugerindo que o método poderia ser repetido para acompanhamento do tratamento. Pizzichini et al.¹⁵ avaliaram os efeitos de glicocorticoide inicialmente administrado por via oral (prednisona por 10 dias) e continuado por via inalatória (budesonida por 21 dias) em adultos asmáticos. Nesse estudo os autores utilizaram o EI durante exacerbação da doença e repetiram-no seriadamente demonstrando os efeitos do tratamento anti-inflamatório em índices como o percentual de eosinófilos e a concentração de ECP e IL-5. Comparando essas medidas com aquelas do sangue, observaram que as medidas sanguíneas eram menores e diminuíram mais rapidamente que no escarro, sugerindo que as medidas no escarro parecem refletir melhor a cinética dos efeitos anti-inflamatórios obtidos com o tratamento.

Estudo longitudinal com asmáticos adultos tratados com corticosteroide inalado (CI) por 90 dias documentou redução no percentual de eosinófilos e de células descamadas do epitélio brônquico já na primeira avaliação (30 dias de tratamento). Esses achados assim se mantiveram até o final do estudo, enquanto o percentual de macrófagos, células habitualmente residentes da via aérea, teve comportamento inverso, denotando o repovoamento da mesma com esse tipo celular à medida que a inflamação eosinofílica diminuiu. Já o VEF₁ só alcançou melhora significativa após 90 dias de tratamento anti-inflamatório, indicando que o monitoramento direto da inflamação eosinofílica pelo EI é capaz de detectar a resposta ao tratamento anti-inflamatório mais precocemente que a avaliação funcional⁷.

O aumento de eosinófilos no escarro induzido foi um bom preditor da perda posterior de controle da asma em crianças após redução da dose de CI¹⁶.

Em indivíduos normais o percentual de eosinófilos no EI varia de 0 a 1,4%¹⁷ e valores acima de 1,5% são indicativos da presença de inflamação eosinofílica e seu aumento se correlaciona com parâmetros clínicos e funcionais de gravidade da asma.

Petsky et al.¹⁸ em revisão sistemática que incluiu três estudos com 221 adultos asmáticos, avaliaram o monitoramento da doença e a decisão por ajuste de doses de CI usando o EI em comparação com a guia da Sociedade Britânica de Tórax

(BTS) que, como outros consensos, utiliza parâmetros clínico-funcionais para isso. Os resultados demonstraram que a utilização do EI resultou em menor número de exacerbações, principalmente as mais graves, sem diferença na dose total de CI utilizada, sugerindo sua utilidade para o monitoramento de asmáticos adultos, com história de exacerbações graves e inflamação eosinofílica.

Gagliardo et al.¹⁹ avaliaram o percentual de eosinófilos e as concentrações de IL-8, metaloproteinase (MMP-9) e inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP-1) no escarro induzido como indicadores de gravidade e de maior número de exacerbações em crianças asmáticas tratadas com associação CI e agente beta2 agonista de longa duração (LABA) durante um ano. Encontraram correlação positiva entre a quantidade de eosinófilos e níveis de IL-8 com a frequência de exacerbações. Antes do início do tratamento anti-inflamatório, mas não após, houve correlação entre MMP-9 e a gravidade da doença e as concentrações de TIMP-1 foram menores na asma moderada em comparação com asma leve.

Em estudo piloto com adultos com asma leve, Chakir et al.²⁰ compararam o monitoramento do tratamento anti-inflamatório usando o EI com parâmetros clínico-funcionais. Após dois anos de controle adequado da doença, realizaram biópsias brônquicas para avaliar a celularidade e a expressão de mucina 5A (MUC5A) e colágeno, como indicadores de remodelamento. No grupo monitorado pelo EI houve redução de eosinófilos e de MUC5A, mas não de neutrófilos, enquanto no grupo monitorado por parâmetros clínico-funcionais, houve redução de eosinófilos e neutrófilos, mas não de MUC5A. Não houve redução da deposição de colágeno subepitelial e a dose média de CI utilizada foi semelhante nos dois grupos.

Na asma ocupacional, estudos demonstraram aumento significativo de leucotrieno C4 (LTC4) e de eosinófilos no EI após broncoprovocação específica. Além disso, a eosinofilia superior a 2% demonstrou ter ótima correlação com a positividade da broncoprovocação²¹.

Estudo interessante sugeriu recentemente que a concentração de zinco no EI pode ser útil como marcador do processo inflamatório na asma. Modelos de asma animal mostram correlação entre a redução do Zn e a inflamação da via aérea. Jayaram et al.²² pesquisaram a concentração de Zn total e livre no EI em asmáticos e indivíduos saudáveis. A concentração de Zn no EI foi menor nos asmáticos e correlacionou-se significativamente com a frequência de sintomas, VEF1 e hiperresponsividade brônquica.

Uma nova possibilidade para o uso do EI diz respeito à comprovação da adesão do paciente ao uso do CI. O propionato de fluticasona foi detectado por espectrometria de massa no EI 16 e 24 horas após ter sido inalado em todos os asmáticos testados²³.

Por abordar de forma direta e não invasiva as áreas mais afetadas pela asma (vias de médio e grosso calibre), ser seguro, reprodutível, capaz de identificar diferenças entre doenças e entre situações clínicas diversas em asmáticos, o EI tem se firmado como método adequado no monitoramento da inflamação brônquica relacionada. Além disso, permite documentar a modulação da ação anti-inflamatória

de glicocorticoides de uso tópico ou sistêmico, principalmente em adultos. Além disso, é método muito útil e não invasivo para diferenciação dos fenótipos de asma eosinofílica e neutrofílica.

Medidas do óxido nítrico expirado

A partir de 1980 foram publicados diversos estudos demonstrando a produção de óxido nítrico (NO) por células de várias espécies de mamíferos. No final daquela década, com a identificação do NO como o responsável pela atividade do então chamado fator de relaxamento derivado do endotélio (*endothelium-derived relaxing factor*, EDRF)²⁴⁻²⁶, abriu-se vasto campo de pesquisas, que resultou no reconhecimento do NO como importante em diversos mecanismos fisiológicos vasculares, neurológicos e imunitários.

Por ser uma molécula extremamente lábil, cuja meia-vida varia de 0,1 a 5 segundos, de acordo com a sua concentração, o pH e com a presença de outras moléculas no meio, o NO possui ações diretas, de forma parácrina, em outras células, e vários efeitos indiretos, dependentes dos compostos dele derivados. Os compostos oxinitrogenados de importância biológica são encontrados em cinco estados de oxidação, representados por 13 moléculas diferentes, sendo de maior importância no aparelho respiratório o próprio radical NO, a menor molécula com atividade biológica conhecida até o momento, e alguns de seus metabólitos como o nitrito (NO₂⁻), produto da reação do NO com oxigênio molecular (O₂) em fase aquosa, nitrato (NO₃⁻), formado em pH ácido a partir do nitrito, peroxinitrito (ONOO⁻) e ácido peroxinitroso (OONOH), formados a partir da reação com o radical superóxido (O₂⁻). Em meio aquoso, o nitrito é estável por várias horas, entretanto no sangue ele é rapidamente transformado em nitrato. Desta forma a concentração basal de nitrito no sangue é muito baixa, enquanto a de nitrato é cerca de 100 vezes maior.

Pela ativação da guanilciclase, o NO aumenta os níveis intracelulares de guanidina-monofostato cíclico (GMP cíclico), causando redução de cálcio intracelular. Tal fenômeno é responsável por relaxamento de células musculares lisas tanto no sistema vascular como em outros tecidos (músculo liso uterino e intestinal). Além disso responde também pela inibição de aderência e agregação plaquetária e inibição da quimiotaxia de neutrófilos, transdução de sinais na neurotransmissão (central e periférica), estando aí incluída a broncodilatação mediada por fibras NANC²⁷⁻³⁰.

Outros efeitos descritos do NO, independentes da ativação de guanilciclase, são a ativação da cicloxigenase em macrófagos, inibição da síntese proteica por hepatócitos, citotoxicidade por inibição de enzimas mitocondriais do Ciclo de Krebs, e inibição da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) por inibição da ribonucleotídeo-redutase, sendo os dois últimos as prováveis bases da atividade inibitória de macrófagos sobre células tumorais^{29,31}.

O peroxinitrito é um potente agente oxidante, pois gera radicais hidroxila (OH), e atua como importante efetor em mecanismos de destruição de microrganismos patogênicos por macrófagos e neutrófilos. Possivelmente também estimule a produção de muco na árvore brônquica e, se produzido em

grande quantidade, pode causar lesão celular e tecidual nos processos inflamatórios crônicos através da peroxidação de lipídeos e nitrosilação de proteínas.

O NO é produzido a partir da ação de três isoformas conhecidas de enzimas (NOS 1 e 3 – constitutivas e NOS2 – induzível) que catalisam a conversão de L-arginina em L-citrulina pela oxidação do nitrogênio guanidínico da primeira. As duas formas constitutivas são estimuladas por bradicinina, acetilcolina, histamina, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF). São inibidas por diversos compostos que competem com a L-arginina como substrato da enzima (NG-nitro-L-arginina metilester– L-NAME, NG-monometil-L-arginina– L-NMMA, NG-nitro-L-arginina– L-NNA e NG-amino-L-arginina– L-NAA), e expressas constitucionalmente em várias células, como fibras nervosas (NOS 1a), células endoteliais (NOS 1b e NOS 3) e neutrófilos (NOS 1c), e essa produção basal de NO é importante no controle do tônus vascular sistêmico e pulmonar, assim como na transmissão do impulso em neurônios centrais e periféricos.

A forma induzível da enzima (NOS 2) produz quantidades muitas vezes maiores de NO que as formas constitutivas e sua expressão já foi identificada em macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos, células endoteliais, mastócitos, histiócitos e fibroblastos. A expressão da NOS 2 é estimulada por IFN γ , lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, TNF α , IL-1 e outras IL, e inibida por IL-10, glicocorticoides e aminoguanidina.

O NO e seus derivados não só participam em mecanismos fisiológicos, como também exercem efeitos deletérios quando em quantidades acima das fisiológicas ou em condições de alteração do pH ou dos estados de oxidação, como ocorre em processos inflamatórios, causando toxicidade para células do epitélio brônquico, vasodilatação, edema da parede brônquica, além de disfunção mucociliar. Além disso, o nitrito aumenta a permeabilidade do epitélio brônquico, ao contribuir para a ruptura das *tight junctions*, e aumenta a produção de TNF α , IL-8 e GM-CSF pelo próprio epitélio.

Os estudos iniciais sobre o NO na asma avaliaram sua utilização como potencial agente terapêutico por seus efeitos sobre o tônus brônquico em asmáticos. O NO administrado por via inalatória em doses de 80 a 100 ppm tem efeito broncodilatador discreto, menor que o dos agonistas beta-adrenérgicos, e que parece ser maior ou mais evidente em grandes vias aéreas e em asmáticos mais leves. Os ensaios terapêuticos com NO inalado em seres humanos não tiveram sucesso, a exceção do seu uso na hipertensão pulmonar do recém-nato. Sua utilização em altas doses está associada à ocorrência de edema pulmonar e metahemoglobinemia. Setenta a 80% do NO inalado são transformados em nitrato, e parte dele se transforma em nitrito, que sistemicamente pode contribuir para toxicidade neural e carcinogênese^{32,33}. Por isso sua aplicabilidade como agente terapêutico na asma foi logo descartada.

Na virada do século XX para XXI, a pesquisa científica direcionou-se na sua produção aumentada como reflexo do processo inflamatório da asma. Isso ocorreu quer de forma direta, pela medida de NO em ar expirado, quer de forma indireta, pela detecção do aumento de expressão de NOS 2

em material pulmonar, ou ainda pela medida de derivados mais estáveis do NO como nitrito e nitrato no LBA ou no escarro induzido.

A dosagem do NO expirado baseia-se na medida de quimioluminescência resultante da emissão de fótons após transformação de NO + NO₃ em NO₂ + O₂. O primeiro aparelho produzido para tal fim foi o NIOX. Posteriormente, foram lançados modelos portáteis (NIOX Mino[®] e NOBreath[®]). As medidas são realizadas em ar ambiente durante expiração contra resistência pré-definida pelo aparelho, o que produz um platô de fluxo expiratório (50 L/min) e mantém o palato mole elevado, impedindo a contaminação pelo ar da cavidade nasal. Estas medidas são denominadas de fração exalada de NO (FeNO).

Em um dos primeiros e mais amplos estudos publicados sobre o assunto³⁴, o FeNO foi medido em indivíduos saudáveis, em pacientes com asma leve sem uso de medicação ou usando apenas beta-agonistas e em asmáticos utilizando dipropionato de beclometasona (DPB) regularmente. O NO expirado foi claramente maior no grupo de asmáticos que não utilizavam glicocorticoide, apesar de terem formas menos graves da doença, enquanto que foi semelhante nos outros dois grupos. Outro estudo publicado naquele mesmo ano também demonstrou aumento do NO expirado em asmáticos quando comparados a indivíduos saudáveis e fumantes³⁵. A redução do FeNO em fumantes provavelmente deve-se a diminuição da atividade de macrófagos na via aérea induzida pelo tabaco.

Nelson et al.³⁶ também demonstraram aumento do FeNO em crianças asmáticas comparadas a saudáveis. Além disso, observaram que o tratamento com glicocorticoide sistêmico reduziu o NO expirado para níveis ainda superiores aos encontrados nas crianças saudáveis, apesar da resolução total da obstrução brônquica medida pela relação VEF₁/CVF, sugerindo que a medida de FeNO seja mais sensível que aquele índice de obstrução brônquica como parâmetro de inflamação.

De acordo com essa observação, foi demonstrado que a medida do FeNO em crianças asmáticas com idades entre 6 e 17 anos, correlacionou-se de forma mais significativa com parâmetros inflamatórios, como eosinofilia periférica, IgE sérica e níveis séricos de ECP do que com VEF₁ e a relação VEF₁/CVF³⁷.

Os níveis de FeNO parecem correlacionar-se com a hiperresponsividade brônquica à metacolina em asmáticos atópicos e virgens de corticoterapia. Essa correlação não está tão bem definida quando se utiliza outros agentes broncoconstritores, como histamina, e se torna mais complexa em pacientes usando CI³⁸.

Na avaliação da resposta à corticoterapia na asma, o FeNO responde de forma mais intensa que o VEF₁ para doses menores de corticosteroide inalado (CI) assim como também parece reduzir de forma mais rápida que a eosinofilia no escarro. Após a retirada do CI há rebote com aumento do FeNO em uma a duas semanas^{38,39}.

Usando coloração por imunocitoquímica para a NOS 2 em células da árvore brônquica obtidas por escarro induzido, observamos a redução da expressão da enzima na avaliação após 30 dias de tratamento, junto à redução da inflamação

eosinofílica, enquanto a melhora do VEF₁ foi mais tardia, alcançando significância estatística apenas aos 90 dias de tratamento⁷.

Em crianças, o ajuste de doses baseado nas medidas do FeNO resultou em melhora mais intensa da hiperresponsividade brônquica se comparado ao ajuste baseado em sintomas, além de ser útil para prever falha na tentativa de redução da dose de CI em crianças com sintomas controlados, assim como mostrou-se um preditor de recorrência da asma após suspensão do CI^{16,40}. Revisão sistemática que incluiu quatro estudos (total de 324 adultos e crianças) mostrou que o ajuste de doses baseado no FeNO resultou em uso de menores doses totais de CI em comparação com o ajuste baseado em parâmetros clínico-funcionais de acordo com guias internacionais de manejo da asma, para um mesmo nível de controle atingido, apenas nos adultos⁴¹.

Já ensaio clínico multicêntrico, duplo-cego e controlado por placebo, realizado em 10 centros diferentes com 546 participantes com idades entre 12 e 20 anos, ao comparar o acompanhamento da asma de acordo com as diretrizes do NAEPP (*National Asthma Education and Prevention Program* 2007) com ou sem a utilização das medidas de FeNO encontrou uso de doses mais elevadas de CI no grupo que usou o FeNO, sem redução do número de dias com sintomas e sem diferença em parâmetros funcionais em comparação ao grupo controle⁴². Esta discrepância de resultados pode ser, ao menos em parte, consequência dos diferentes pontos de corte utilizados para medidas de FeNO nos dois estudos citados (15-35 ppb¹⁸ e 20-40 ppb⁴²), assim como de diferenças na classificação de frequência de sintomas (p.ex. a utilizada no segundo estudo, incluía na classe mais leve de frequência pacientes com zero até três dias de sintomas, todos utilizando a mesma dose de CI).

Foram propostos valores normais de FeNO por diferentes autores. De forma geral podem ser considerados normais níveis de 5 a 25 ppb em adultos e 5 a 20 ppb em crianças. Níveis inferiores a 5 ppb em adultos correlacionam-se com tabagismo (por redução da atividade e produção de NO por macrófagos pulmonares) e em crianças podem ser encontrados na discinesia ciliar, fibrose cística e doença pulmonar crônica associada à prematuridade. Em asmáticos, níveis aumentados de FeNO indicam presença de inflamação eosinofílica, podendo representar perda do controle da doença mesmo antes do surgimento ou agravamento de sintomas. Níveis muito altos, acima de 50 ppb, representam processo inflamatório brônquico eosinofílico de grande intensidade e são preditores de boa resposta terapêutica a corticoterapia^{38,43}.

Os diferentes valores propostos como normais para adultos foram comparados aos melhores valores obtidos após corticoterapia sistêmica (prednisona 30 mg/dia por 14 dias) em 73 asmáticos. A média das melhores medidas de FeNO atingidas após o tratamento foi 17,7 ppb, enquanto que a média das medidas em situação de perda de controle da asma foi 27,6 ppb⁴⁴.

Na população geral o aumento do FeNO não é útil para diagnóstico de asma, pois aumenta em vários processos inflamatórios das vias aéreas, como infecções agudas ou

crônicas, além de ser influenciado pela ingestão de aditivos (nitritos e nitratos). Entretanto, em pacientes com história sugestiva de asma, o FeNO pode ser útil para confirmação diagnóstica, principalmente em crianças menores, que não conseguem realizar a espirometria⁴⁵, ou em crianças maiores e adultos, onde a espirometria não foi conclusiva. Na presença de história clínica, níveis superiores a 76 ppb são suficientes para o diagnóstico de asma, enquanto níveis entre 46 e 75 ppb são fortemente sugestivos e valores abaixo de 16 ppb afastam o diagnóstico de asma⁴⁶.

Na asma pediátrica o FeNO tem se mostrado ferramenta prática para auxiliar o diagnóstico assim como para identificar as crianças que se beneficiarão de corticoterapia inalatória, além de ser útil para monitorar a redução de dose da mesma¹⁶.

Gagliardo et al.¹⁹, acompanhando crianças asmáticas por um ano, observaram correlação direta entre FeNO e número de exacerbações e demonstraram que a medida do FeNO foi capaz de separar aquelas com maior risco de apresentar duas ou mais exacerbações (FeNO > 20 ppb) das que tiveram apenas uma ou nenhuma exacerbação (FeNO < 20 ppb) durante o estudo. Desta forma, o acompanhamento da asma infantil com FeNO pode ser útil indicando a maximização de doses de medicação visando a redução de risco de exacerbações.

A medida do FeNO também parece ser útil no diagnóstico diferencial do broncoespasmo induzido pelo exercício (BIE) em crianças e também no diagnóstico diferencial da tosse em adultos. Malmberg et al.⁴⁷ compararam crianças sibilantes com idades entre 3 e 7 anos com e sem broncoespasmo induzido por exercício (BIE) e observaram que o FeNO era maior nas crianças com BIE. Níveis superiores a 28 ppb tiveram valor preditivo positivo para BIE maior do que 90%.

O FeNO também foi avaliado como ferramenta no diagnóstico de tosse crônica em 540 adultos jovens⁴⁸. Foram encontrados níveis muito elevados (média = 86 ppb) nos casos de tosse cujo diagnóstico confirmado foi de asma, níveis moderados (média = 37 ppb) nos casos de rinosinusite e níveis normais nos casos de tosse associada a doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE), semelhantes aos dos controles sadios (médias = 14,7 ppb e 12 ppb, respectivamente).

O FeNO não tem boa correlação com a inflamação neutrofílica de vias aéreas, não sendo tão útil como marcador do processo inflamatório nos fenótipos de asma grave neutrofílica. Estudo recente mostrou, em adultos com asma grave refratária, que o FeNO foi maior (média de 43 ppb) do que na asma moderada (média de 25 ppb). A correlação dessas medidas foi inversamente proporcional a infiltração neutrofílica no escarro, confirmando achados anteriores quanto a pouca utilidade do FeNO nos fenótipos de asma neutrofílica⁴⁹.

Na asma ocupacional, medidas de afastamento do agente ocupacional envolvido levam a redução do FeNO, porém sua medida após broncoprovocação específica, com o alérgeno ocupacional, mostrou correlação variável¹⁷.

As observações de que os níveis do FeNO estão aumentados nos asmáticos, diminuídos nos pacientes que recebem CI e correlacionados significativamente com o número de eosinófilos no EI sustentam a associação direta entre FeNO

e inflamação eosinofílica da via aérea. As evidências atuais apontam para a potencial utilidade da medida do FeNO como procedimento clínico fácil e prático no diagnóstico diferencial, avaliação da gravidade e da resposta ao tratamento em adultos e crianças com asma.

Confirmando esta impressão, recentemente a *American Thoracic Society* (ATS) publicou um guia prático para uso das medidas de FeNO na prática clínica⁵⁰. O guia recomenda que as medidas de FeNO sejam utilizadas para apoiar o diagnóstico de asma quando faltam parâmetros objetivos como as provas funcionais pulmonares, acompanhar a inflamação das vias aéreas em asmáticos e avaliar a potencial resposta ao tratamento com CI. Além disso, lembra que a persistência de níveis altos de FeNO pode ser consequência de persistência ou alta exposição a alérgenos.

Foram propostos, neste documento, os seguintes pontos de corte nos valores de FeNO para apoiar decisões clínicas:

- valores menores que 25 ppb em adultos e 20 ppb em crianças diminuem a probabilidade da existência de inflamação eosinofílica e de resposta ao tratamento com CI;
- valores superiores a 50 ppb em adultos e a 35 ppb em crianças aumentam a probabilidade da presença de inflamação eosinofílica e de resposta ao CI em pacientes sintomáticos;
- valores entre 25 e 50 ppb em adultos, e entre 20 e 35 ppb em crianças, devem ser interpretados com cuidado e correlacionados com o quadro clínico.

Além disso, sugere que aumentos do FeNO $\geq 20\%$ do valor anterior (para valores basais maiores que 50 ppb) e aumentos ≥ 10 ppb em relação ao valor anterior (na faixa basal menor que 50 ppb), sejam interpretados como aumento significativo da inflamação da via aérea, enquanto as reduções nas mesmas proporções após tratamento significam boa resposta à terapia anti-inflamatória.

Condensado do ar expirado

O condensado do ar expirado (do inglês *expired breath condensate* – EBC) é o resultado da condensação do vapor de água no ar expirado através de um sistema de tubos resfriados. O líquido obtido solubiliza substâncias voláteis e não voláteis das vias aéreas. Vem sendo pesquisado intensamente nos últimos 10 anos para obtenção de material da via aérea inferior em diversas doenças pulmonares, além da asma (DPOC, bronquiectasia, fibrose cística e síndrome de angústia respiratória) e também já vem sendo utilizado na prática clínica para diagnóstico da tosse associada à DRGE.

No material obtido por esta técnica é possível dosar diversas substâncias que podem apresentar-se aumentadas ou diminuídas nos processos inflamatórios. Estão sendo estudados como marcadores de estresse oxidativo: peróxido de hidrogênio, 8-isoprostano e derivados estáveis do NO, como nitrito e nitrato (aumentados em asmáticos *versus* controles e normalizados com corticoterapia).

Mediadores inflamatórios e citocinas também têm sido investigados. Estudos encontraram aumento de LTB4 e prostaglandina E2 (PGE2) em DPOC, mas com resultados

conflitantes na asma. Leucotrienos cisteínicos (Cys-LT) têm sido demonstrados aumentados em crianças com asma associada ao exercício, em adultos com asma grave *versus* asma leve e moderada e na asma associada à aspirina. Em crianças com asma a IL-4 está aumentada enquanto o IFN- γ está reduzido em comparação com crianças saudáveis, entretanto as medidas de IL são as mais difíceis, devido à baixa concentração destas substâncias no EBC.

Nos processos inflamatórios das vias aéreas, inclusive na asma, a medida do hidrogênio no EBC está aumentada, ou seja, o pH está diminuído. Na asma há redução do pH durante as crises, mas esta medida tem se mostrado particularmente útil no diagnóstico diferencial da tosse associada a DRGE, na qual esta redução é ainda mais proeminente durante os episódios de tosse. O EBC mostrou-se promissor ao diferenciar os casos de asma grave de difícil controle dos casos de asma moderada, onde as medidas médias de pH foram mais baixas no primeiro grupo (respectivamente 7,22 e 7,36), enquanto que nos controles foi 7,72⁴⁹.

Em adultos, o nível de 8-isoprostano no EBC foi significativamente maior na asma em comparação com controles, e também foi maior na asma grave em comparação a moderada e leve, podendo ser útil como marcador de gravidade da doença. No mesmo estudo os autores observaram que a dosagem de Cys-LT também foi maior na asma grave em comparação à moderada e leve, mas não houve diferença significativa entre asmáticos leves e controles⁵¹. Também está mais aumentado na asma associada à sensibilidade ao AAS e na asma associada à obesidade.

Em crianças, os níveis de 8-isoprostano e de LTB4 foram maiores na asma em comparação aos controles e também foram maiores na asma moderada em comparação à asma intermitente⁵².

Robroeks et al.⁵³, utilizando métodos mais sensíveis de detecção de mediadores e citocinas no EBC, conseguiram demonstrar aumento significativo de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IFN γ , CCL3, CCL5, CXCL10, MCP1, ICAM e VCAM em crianças asmáticas *versus* saudáveis. Este método abre a perspectiva de utilização do EBC para pesquisa de diferentes substâncias envolvidas na inflamação brônquica da asma.

Os estudos com EBC têm grande potencial, pois a coleta é feita durante respiração espontânea em volume corrente, é fácil, rápida e segura, inclusive em crianças e pacientes graves. Reflete o estresse oxidativo, acidificação e inflamação na via aérea e a medida do pH parece ser um potencial marcador inflamatório, além de identificar a tosse associada a DRGE. Ainda falta melhor padronização do método tanto no que diz respeito aos dispositivos usados para coleta como para os métodos de dosagem de cada substância ou grupo de substâncias estudadas⁵⁴.

Outros métodos de investigação

Temperatura do ar expirado

A produção de calor é uma das características de qualquer processo inflamatório. Partindo dessa premissa, alguns estudos avaliaram a utilidade da medida da tem-

peratura do ar expirado (TAE) como marcador do processo inflamatório na asma.

Em estudo em adultos com asma e controles, a variação de TAE foi maior nos asmáticos em comparação aos controles saudáveis⁵⁵. O mesmo grupo de pesquisadores encontrou correlação positiva dela com o fluxo sanguíneo brônquico e com medidas de FeNO em asmáticos e a temperatura foi igualmente normalizada com uso de budesonida inalada⁵⁶. Também foi relatada correlação positiva da TAE com MMP-9 no escarro induzido, o que sugere potencial correlação deste biomarcador com alterações relacionadas ao remodelamento brônquico na asma⁵⁷.

Em crianças, foi demonstrado o aumento de TAE após exacerbações associadas a infecção viral⁵⁸ e em estudo piloto realizado no Brasil, Melo et al.⁵⁹, encontraram redução média de 1 °C na temperatura do ar expirado em asmáticos após 6 semanas de tratamento com corticosteroide inalado, associado ou não a corticosteroide sistêmico nos primeiros dias, sugerindo seu potencial uso na avaliação da resposta ao tratamento anti-inflamatório.

Medida do gás carbônico no ar expirado

O gás carbônico (CO₂) está presente normalmente no ar expirado e também foi investigado como marcador inflamatório da via aérea. Metanálise recente, que incluiu 18 estudos, observou aumento significativo do CO₂ expirado em asmáticos *versus* controles saudáveis, porém sua medida não distinguiu asmáticos com ou sem uso de CI e nem controlados *versus* não controlados⁶⁰. Tais dados sugerem pouco potencial de utilização deste parâmetro no acompanhamento da asma.

Conclusões

Os métodos não invasivos de monitoramento da inflamação na asma continuam sendo amplamente investigados em diferentes situações e novos métodos vêm surgindo, como potenciais candidatos ao uso na prática clínica.

O escarro induzido aborda de forma direta e não invasiva as áreas mais afetadas na asma, é relativamente seguro, reprodutível e tem se firmado como um método bastante adequado para diferenciação dos fenótipos de asma eosinofílica e neutrofílica, assim como para investigação repetida da inflamação brônquica relacionada à asma, incluindo a sua modulação por glicocorticoides inalados. Aspectos metodológicos do processamento do material obtido ainda impedem sua utilização ampla na prática clínica, mas tem sido usado rotineiramente em centros universitários no Brasil e no mundo.

As medidas do FeNO têm excelente reprodutibilidade e correlação com a inflamação eosinofílica em grandes vias aéreas, além disso é um bom preditor de resposta ao corticosteroide inalado e identifica precocemente as exacerbações da asma. A utilização de aparelhos portáteis, devido a sua praticidade, vem ganhando progressivamente mais espaço como ferramenta útil ao acompanhamento da asma pediátrica nos Estados Unidos e Europa. Na asma em adultos, mostra utilidade no fenótipo de asma eosinofílica,

porém ainda necessita de mais estudos para ter seu papel devidamente estabelecido.

O EBC tem grande potencial, pois a coleta é feita durante respiração espontânea em volume corrente, é fácil, rápida e segura, inclusive em crianças e pacientes graves. Pode ser particularmente útil também como método para utilização em medicina geral e preventiva, sinalizando de forma simples e rápida, a presença de inflamação na via aérea em diversas condições. Entretanto, ainda carece de padronização para coleta e para análise de várias substâncias.

Outros parâmetros, como temperatura do ar expirado, têm sido investigados como marcadores da inflamação da asma, porém ainda necessitam melhor e maior avaliação quanto a sua potencial utilidade no monitoramento da asma.

Os estudos mais recentes apontam para a utilização combinada e complementar destes diferentes métodos e, provavelmente, em futuro mais ou menos próximo, a avaliação da gravidade da inflamação brônquica e a avaliação da resposta ao tratamento anti-inflamatório da asma serão realizadas por um conjunto destes parâmetros, aliados aos parâmetros clínicos e funcionais já disponíveis, o que aumentará muito a eficiência da avaliação da gravidade, da resposta ao tratamento e, conseqüentemente, do nível de controle da asma. Questões relacionadas à relação custo-efetividade dos métodos descritos ainda necessitam serem estudadas.

Referências

1. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia, Sociedade Brasileira de Pediatria. IV Diretrizes brasileiras para o manejo da asma. Rev bras alergologia imunopatol 2006;29(5):222-44.
2. WHO. Global initiative for asthma (GINA), update 2010. Disponível em http://www.ginasthma.org/pdf/GINA_Report_2010.pdf. acessado em 07/2011.
3. Murugan A, Prys-Picard C, Calhoun WJ. Biomarkers in asthma. Curr Opin Pulm Med 2009;15:12-8.
4. Bigby TD, Margolskee D, Michael PF, Sheppard D, Hadley WK, Hopewell PC. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Am Rev Respir Dis 1986;113:515-8.
5. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. Thorax 1992;47:25-9.
6. Pin I, Freitag AP, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Watson RM, Dolovich J, et al. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. Am Rev Respir Dis 1992;145:1265-9.
7. Costa E, Ribeiro M, Bandeira L, Kalichstein M, Cardoso A, Lago P, et al. Modulação da expressão da sintase induzível de óxido nítrico pelo glicocorticoide inalado na asma brônquica. Rev bras alergologia imunopatol 2004;27(1):19-29.
8. Fireman E, Toledano B, Buchner N, Stark M, Schwarz Y. Simplified detection of eosinophils in induced sputum. Inflamm Res 2011;60(8):745-50.
9. Pizzichini MMM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced profile of induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:866-9.

10. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: Reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:308-17.
11. Bacci E, Cianchetti S, Paggiaro PL, Carnevali S, Bancalari L, Dente FL, et al. Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma. *Clin Exp Allergy* 1996;26:1395-400.
12. Konno S, Gonokami Y, Kurokawa M, Kawazu K, Asano K, Okamoto K, et al. Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109:73-8.
13. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:449-53.
14. Claman DM, Boushey HA, Liu J, Wong H, Fahy JV. Analysis of induced sputum to examine the effects of prednisone on airway inflammation in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:861-9.
15. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma. Kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1501-8.
16. Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, et al. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(10):1077-82.
17. Quirce S, Lemièrre C, de Blay F, del Pozo V, Gerth Van Wijk R, Maestrelli P, et al. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *EAACI Consensus Report. Allergy* 2010;65(4):445-58.
18. Petsky HL, Kynaston JA, Turner C, Li AM, Cates CJ, Lasserson TJ, et al. Tailored interventions based on sputum eosinophils versus clinical symptoms for asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(2):CD005603.
19. Gagliardo R, La Grutta S, Chanez P, Profita M, Paternò A, Cibella F, et al. Non-invasive markers of airway inflammation and remodeling in childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20(8):780-90.
20. Chakir J, Loubaki L, Laviolette M, Milot J, Biardel S, Jayaram L, et al. Monitoring sputum eosinophils in mucosal inflammation and remodelling: a pilot study. *Eur Respir J* 2010;35(1):48-53.
21. Quirce S, Lemièrre C, de Blay F, del Pozo V, Gerth Van Wijk R, Maestrelli P, et al. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy* 2010;65(4):445-58.
22. Jayaram L, Chunilal S, Pickering S, Ruffin RE, Zalewski PD. Sputum zinc concentration and clinical outcome in older asthmatics. *Respirology* 2011;16(3):459-66.
23. Hagan JB, Taylor RL, Kita H, Singh RJ. Analysis of fluticasone propionate in induced sputum by mass spectrometry. *Allergy Asthma Proc* 2011;32(4):18-21.
24. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:9265-69.
25. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987;61:866-79.
26. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
27. Ellis JL, Udem BJ. Inhibition by L-N-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airways. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1543-7.
28. Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993;48:1034-43.
29. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993;54:171-8.
30. Mizutani T, Layon AJ. Clinical applications of nitric oxide. *Chest* 1996;110:506-24.
31. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng J Med* 1993; 329(27):2002-12.
32. Hogman M, Frostell CG, Hedenstrom H, Hedesterna G. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1474-8.
33. Kacmarek RM, Ripple R, Cockrill BA, Bloch KJ, Zapol WM, Johnson DC. Inhaled nitric oxide - a bronchodilator in mild asthmatics with methacholine-induced bronchospasm. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:128-35.
34. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-5.
35. Persson MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994;343:146-7.
36. Nelson BV, Sears S, Woods J, Ling CY, Hunt J, Clapper LM, Gaston B. Expired nitric oxide as a marker for childhood asthma. *J Pediatr* 1997;130(3):423-7.
37. Strunk RC, Szeffler SJ, Phillips BR, Zeiger RS, Chinchilli VM, Larsen G, et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112(5):883-92.
38. Pendharkhar S, Mehta S. The clinical significance of exhaled nitric oxide in asthma. *Can Respir J* 2008;15(2):99-106.
39. Silkoff PE, McClean P, Spino M, Erlich L, Slutsky AS, Zamel N. Dose-response relationship and reproducibility of the fall in exhaled nitric oxide after inhaled beclomethasone dipropionate therapy in asthma patients. *Chest* 2001;119(5):1322-8.
40. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, et al. European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008;63(1):5-34.
41. Petsky HL, Cates CJ, Li AM, Kynaston JA, Turner C, Chang AB. Tailored interventions based on exhaled nitric oxide versus clinical symptoms for asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(2):CD006340.
42. Szeffler SJ, Mitchell H, Sorkness CA, Gergen PJ, O'Connor GT, Morgan WJ, et al. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomized controlled trial. *Lancet* 2008;372(9643):1065-72.
43. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-30.
44. Smith AD, Cowana JO, Taylor R. Exhaled nitric oxide levels in asthma: Personal best versus reference values. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(4):714-8.
45. Pijnenburg MW, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review. *Clin Exp Allergy* 2008;38(2):246-59.
46. Schneider A, Tilemann L, Schermer T, Gindner L, Laux G, Szecsenyi J, et al. Diagnosing asthma in general practice with portable exhaled nitric oxide measurement: results of a prospective diagnostic study: FENO < or = 16 ppb better than FENO < or = 12 ppb to rule out mild and moderate to severe asthma. *Respir Res* 2009;3;10:15.
47. Malmberg LP, Pelkonen AS, Mattila PS, Hammarén-Malmi S, Mäkelä MJ. Exhaled nitric oxide and exercise-induced bronchoconstriction in young wheezy children - interactions with atopy. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20(7):673-8.
48. Kowal K, Bodzenta-Lukaszyk A, Zukowski S. Exhaled nitric oxide in evaluation of young adults with chronic cough. *J Asthma* 2009;46(7):692-8.
49. Tseliou E, Bessa V, Hillas G, Delimpoura V, Papadaki G, Roussos C, et al. Exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH in severe refractory asthma. *Chest* 2010;138(1):107-13.

50. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CH, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:602-15.
51. Samitas K, Chorianopoulos D, Vittorakis S, Zervas E, Economidou E, Papatheodorou G, et al. Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity. *Respir Med* 2009;103(5):750-6.
52. Caballero BS, Martorell AA, Cerdá MJC, Belda RJ, Navarro IR, Navarro SA, et al. Leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with episodic and persistent asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20(3):237-43.
53. Robroeks CM, Rijkers GT, Jöbsis Q, Hendriks HJ, Damoiseaux JG, Zimmermann LJ, et al. Increased cytokines, chemokines and soluble adhesion molecules in exhaled breath condensate of asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 2010;40(1):77-84.
54. Popov TA. Human exhaled breath analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 106(6):451-6.
55. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Faster rise of exhaled breath temperature in asthma: a novel marker of airway inflammation? *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(2):181-4.
56. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Correlation of exhaled breath temperature with bronchial blood flow in asthma. *Respir Res* 2005;6:15.
57. Piacentini GL, Peroni DG, Bodini A, Corradi M, Boner AL. Exhaled breath temperature as a marker of airway remodelling in asthma: a preliminary study. *Allergy* 2008;63(4):484-5.
58. Xepapadaki P, Xatzioannou A, Chatzicharalambous M, Makrinioti H, Papadopoulos NG. Exhaled breath temperature increases during mild exacerbations in children with virus-induced asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153(1):70-4.
59. Melo RE, Popov TA, Solé D. Exhaled breath temperature, a new biomarker in asthma control: a pilot study. *J Bras Pneumol* 2010;36(6):693-9.
60. Zhang J, Yao X, Yu R, Bai J, Sun Y, Huang M, et al. Exhaled carbon monoxide in asthmatics: a meta-analysis. *Resp Res* 2010;11:50-60.

Correspondência:

Eduardo Costa
Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ,
Serviço de Medicina Interna
Av. 28 de setembro, 77 - 3º andar - Vila Isabel
20551-030 - Rio de Janeiro, RJ
E-mail: alergiamuno-uerj@hotmail.com