

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



EFEITO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A CHUMBO NOS
NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS MEDIDAS NO
CONDENSADO DO AR EXALADO

BRUNA RAFAELA FERREIRA BATISTA

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



EFEITO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A CHUMBO NOS
NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS MEDIDAS NO
CONDENSADO DO AR EXALADO

Dissertação de Mestrado orientada pela Dra. Ana Maria Crespo (FCUL) e pela
Dra. Teresa Pinheiro (ITN)

BRUNA RAFAELA FERREIRA BATISTA

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2009

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN) e nos laboratórios do CBA da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Teresa Pinheiro, pela orientação prestada, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, pela boa-disposição e agrado com que sempre me tratou, por toda a ajuda, apoio e paciência, o meu profundo agradecimento.

À Dra. Ana Crespo, por me ter possibilitado a realização desta tese, apoio e preocupação. Um obrigado.

À Patrícia Napoleão pela ajuda e simpatia.

Ao Dr. Carlos Lopes pelo agrado e disponibilidade.

A todos os trabalhadores e voluntários que contribuíram para este trabalho.

A todo o pessoal do ITN, pela forma simpática com que me acolheu. Um obrigado especial à Cristiana pela ajuda e orientação nos momentos em que me senti meia perdida. Ao Sérgio e ao Pedro pelo apoio e ajuda. A vocês e aos elementos mais recentes do “grupo”, um obrigada pelas brincadeiras e pelo carinho, e por tornarem os momentos de trabalho muito mais divertidos!

Às minhas princesas por tudo! Pela amizade, companheirismo e apoio constante, ou seja, pelo verdadeiro espírito de “coki”. Um obrigado, também, por terem tornado a faculdade os melhores anos da minha vida.

Aos restantes amigos, por todas as palavras de incentivo que sempre me deram e por estarem sempre lá para mim.

A ti, por todos os “vai-correr-tudo-bem”, toda a segurança que tens em mim e toda a força que me dás.

Aos meus pais por tudo e mais alguma coisa. Por todo o investimento na minha formação, por todo o apoio que sempre me deram, pelos abraços de força e por todo o vosso amor, e principalmente, por serem uns pais presentes em tudo na minha vida. A vocês dedico a este trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O chumbo (Pb) - aspectos gerais	1
1.1.1 Efeitos da absorção do chumbo e patologias associadas	1
1.2 Condensado do ar exalado	4
1.3 Reactividade pulmonar.....	5
1.3.1 Interleucina 1 β (IL-1 β) e tumor necrose factor- α (TNF- α).....	6
1.3.2 Óxido Nítrico (NO)	7
2. OBJECTIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Grupos e desenho do estudo	11
3.2 Avaliação médica	11
3.3 Caracterização do ambiente de trabalho.....	12
3.4 Recolha de EBC	12
3.5 Medição do óxido nítrico exalado.....	13
3.6 Determinação das concentrações de citocinas no EBC	14
3.6.1 Determinação da concentração de IL-1 β por ELISA.....	15
3.6.2 Determinação da concentração de TNF- α por ELISA.....	18
3.7 Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS	21
4.1 Caracterização dos grupos.....	21
4.2 Caracterização do ambiente de trabalho.....	22
4.3 Recolha de EBC	23
4.4 Avaliação clínica	24
4.5 Determinação de óxido nítrico exalado.....	25
4.6 Determinação da concentração de citocinas no EBC	27

4.6.1	Determinação da concentração de IL-1 β no EBC	27
4.6.2	Determinação da concentração de TNF- α	33
4.6.3	Sumários dos resultados	36
4.7	Análise comparativa dos dados	37
5.	DISCUSSÃO	41
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8.	ANEXOS	53
	ANEXO 1.....	53
	ANEXO 2.....	56
	ANEXO 3.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese e acção da IL-1 β na neutrofilia e febre.....	6
Figura 2 – Análise do ar exalado: comparação entre o estado de standardização para o NO e para o EBC.....	7
Figura 3 – Aparelho de recolha de EBC: a) desenho esquemático do EcoScreen; b) material descartável e não descartável usado no EcoScreen.....	13
Figura 4 – Aparelho automático de medição de NO exalado, NIOX MINO.....	14
Figura 5 – Média das concentrações de material particulado (PM) suspenso no ar recolhido na fábrica A, em ambiente <i>indoor</i> e ambiente <i>outdoor</i> , nas três escalas de diâmetro.....	22
Figura 6 – Concentrações de partículas de chumbo, nas duas escalas de dimensão, nos três ambientes estudados.....	23
Figura 7 – Comparação entre os níveis de NO exalado (em ppb) para os três grupos em estudo: grupo controlo, grupo A e grupo B.....	26
Figura 8 – Diferença para níveis de NO exalado (em ppb) entre os indivíduos que apresentaram queixas alérgicas e os que não apresentaram, durante a avaliação médica.....	27
Figura 9 – Curva de calibração do ensaio de validação da matriz de EBC, e respectivos parâmetros de curva.....	28
Figura 10 – Curva de calibração linearizada a partir da curva do gráfico da figura 9, e respectivos parâmetros.....	28
Figura 11 – Curva de calibração obtida no 2º ensaio para determinação das concentrações de IL-1 β nas amostras de EBC, e respectivos parâmetros.....	30
Figura 12 – Curvas de calibração a) e b) usadas no ensaio 1 e 2, e respectivos parâmetros de curva.....	33
Figura 13 – Comparação para os níveis de NO exalado (em ppb) entre fumadores e não-fumadores, para os dados totais.....	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos volumes utilizados dos reagentes e das três amostras, para a dopagem com a solução de 0,8 pg/ml.....	17
Tabela 2 – Descrição dos volumes utilizados dos reagentes e de amostras, para a dopagem com a solução de 80 pg/ml.....	17
Tabela 3 – Descrição dos volumes de reagentes e amostras utilizadas nos ensaios para determinação de TNF- α nas amostras de EBC.....	19
Tabela 4 – Características demográficas para o grupo A, grupo B e grupo controle obtidas durante o inquérito sumário realizado aquando a recolha do EBC.....	21
Tabela 5 – Médias dos volumes de EBC recolhidos para o grupo A, grupo B e grupo controle.....	23
Tabela 6 – Resultados dos diferentes parâmetros espirométricos e IMC para o grupo A obtidos durante a avaliação médica, e níveis de chumbo no sangue para o grupo A e B.....	24
Tabela 7 – Valores de NO exalado para os três grupos de estudo e número de indivíduos com histórico alérgico.....	25
Tabela 8 – Doenças/sintomas alérgicos apontados, e valores e médias NO exalado correspondentes, para os indivíduos de todos os grupos.....	26
Tabela 9 – Absorvâncias e concentrações de IL-1 β para as amostras de EBC usadas na validação da matriz	29
Tabela 10 – Absorvâncias e concentrações de IL-1 β obtidas nas amostras de EBC e soro usadas no 2º ensaio.....	31
Tabela 11 – Absorvâncias e concentrações de TNF- α das amostras de EBC e soro analisadas.....	34
Tabela 12 – Coeficientes de correlação de Spearman (salvo exceções referenciadas) entre as variáveis em estudo.....	38
Tabela 13 – Coeficientes de correlação de Pearson que apresentam significância para as variáveis em estudo, para o grupo A.....	39

Tabela 14 – Coeficientes de correlação de Spearman que apresentam significância para as variáveis em estudo, para o grupo B.....	40
--	----

RESUMO

A exposição crónica ao chumbo é um problema actual de saúde pública, tendo sido associada a diversas patologias do ser humano, principalmente ao nível industrial, em que o chumbo faz parte dos processos fabris. A monitorização regular deste metal em ambiente ocupacional utiliza tradicionalmente métodos invasivos, como a análise de bioindicadores em sangue e urina. Neste trabalho estudou-se um método não-invasivo, que consiste numa matriz biológica alvo de investigação actual: o condensado de ar exalado (EBC). A análise deste condensado permite obter informação sobre a reactividade e os processos inflamatórios das vias aéreas respiratórias.

Pretendeu-se avaliar a resposta das vias respiratórias à exposição ocupacional e, principalmente, se a análise da composição do EBC poderá constituir um procedimento de avaliação individual na exposição ao chumbo. Analisaram-se dois grupos de trabalhadores expostos a chumbo e um grupo controlo. Para todos os indivíduos obtiveram-se os níveis de óxido nítrico (NO) exalado e recolheram-se amostras de EBC, a partir das quais foram determinados os níveis de citocinas, interleucina-1 β (IL-1 β) e factor de necrose tumoral (TNF- α) por ELISA. Foi necessário proceder-se à validação e optimização do método ELISA para a determinação de citocinas na matriz do EBC. Contudo, obtiveram-se resultados abaixo do limite de detecção para ambas as citocinas, evidenciando a vulnerabilidade deste método de análise e a necessidade de aprofundar aspectos metodológicos que garantam a estabilização de citocinas.

Verificaram-se correlações dos níveis de NO no ar exalado com hábitos tabágicos e queixas alérgicas. Estes resultados evidenciam a potencialidade deste indicador para avaliação clínica.

Embora, não se tivessem verificado correlações entre os níveis de NO no ar exalado e de chumbo no sangue, a possibilidade dos níveis de NO estarem relacionados com a exposição a este metal só poderá ser afastada após o estudo da relação desta molécula com um indicador directo de exposição. Este indicador pode ser obtido medindo as concentrações de chumbo no EBC.

Os resultados obtidos neste estudo são de extrema utilidade na validação do procedimento de recolha e análise de biomarcadores inflamatórios em EBC, de modo a que possa ser futuramente aplicado na biomonitorização de poluentes em ambientes diversos.

ABSTRACT

Chronic exposure to lead is a current public health problem and has been associated with several diseases in humans, mainly in some industrial sectors where lead is used or is present during the manufacturing processes. Conventionally, monitoring of this metal in the occupational environment uses invasive methods, such as analysis of biomarkers in blood and urine. We studied a noninvasive method consisting of a biological matrix that has been recently investigated: the exhaled breath condensate (EBC). The analysis of this condensate provides information of airway reactivity and inflammation.

We intended to evaluate the response of airways to lead exposure at the occupational level and especially if the analysis of EBC composition might be a valid procedure to assess individual lead exposure. The study population consisted on two groups of workers which were exposed to lead and a control group that was free of lead. For all subjects, we obtained the exhaled nitric oxide (NO) levels and collected EBC samples, from which we measured interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF- α) levels, by ELISA. It was necessary the validation and optimization of the ELISA method for cytokines quantification in EBC matrix. Nevertheless, our results were below the limit of detection for both cytokines, indicating the vulnerability of this analysis and the need of further methodological improvement that would ensure the stabilization of cytokines.

Through this analysis we were able to observe a correlation between the NO levels in exhaled air, smoking habits and allergic complaints. These results suggest this method as a potential indicator for clinical evaluation.

Although we didn't find any correlations between the exhaled NO levels and blood lead levels, we can only exclude the possibility that the exhaled NO is related to lead exposure after the study of the relationship of this molecule with a direct indicator of exposure. This indicator can be obtained by measuring the lead concentrations in EBC.

The results achieved by this study might be very useful for the validation of the collection procedure and inflammatory biomarkers analysis in EBC, so that in the future it can be applied in the biomonitoring of pollutants in different environments.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O chumbo (Pb) – aspectos gerais

É o metal pesado mais abundante na crosta terrestre e tem sido utilizado pela humanidade desde há milhares de anos. A generalização da sua utilização numa grande variedade de aplicações pode ser atribuída, principalmente, à abundância do metal na natureza e à sua facilidade de extração do meio ambiente. Além disso, o chumbo é um elemento simples de trabalhar (altamente maleável e dúctil) e de fácil fundição ^[1]. É utilizado em muitas indústrias, incluindo fundição e processamento de chumbo, fabricação de baterias, soldadura, fabrico de plástico, cabos, munições e cerâmica e em processos de reciclagem de baterias ^[2]. Devido à sua importância industrial, o chumbo é um dos contaminantes ocupacionais e ambientais mais conhecidos e mais amplamente estudados, tendo sido uma importante causa de morte e morbidade durante a Revolução Industrial e um controlo eficaz para trabalhadores expostos ao chumbo não ocorreu até ao trabalho do pioneiro de saúde ocupacional, Ronald Lane em 1949 ^[3]. Isto porque, como contaminante, o chumbo causa diversos efeitos adversos no organismo humano e ambiente, que têm sido um importante alvo de estudo para a área científica, devido às patologias que se têm registado e associado à exposição a este elemento.

1.1.1 Efeitos da absorção do chumbo e patologias associadas

As formas orgânicas e inorgânicas do chumbo são absorvidas pelos pulmões e pelo tracto gastrointestinal; compostos de chumbo orgânico podem também ser absorvidos pela pele. Ao nível da exposição ocupacional, a inalação é a via mais comum de absorção, enquanto para a população em geral é através da ingestão/dieta ^[2]. A contaminação de águas de consumo (devido à utilização de canalizações de chumbo), comidas enlatadas, suplementos de dieta, tintas e combustíveis são algumas das fontes de chumbo existentes, ainda nos dias de hoje, em todo o mundo. Estima-se que 80% dos países subdesenvolvidos ainda hoje usam gasolina com chumbo. Nestes países ainda se registam níveis elevados de chumbo no sangue ^[4], contrastando com a queda dos níveis de chumbo em populações de países onde se banuiu a utilização de chumbo como aditivo da gasolina. No entanto, a nível industrial existem fontes emissoras de chumbo que, ainda nos nossos dias, são motivo de preocupação e estudo, em termos ocupacionais.

Este elemento tóxico acumula-se no organismo e interage com as células, apresentando características comuns a outros metais essenciais. Por esta razão, o chumbo pode afectar todos os órgãos e sistemas do organismo, e os mecanismos de toxicidade envolvem processos bioquímicos que incluem a capacidade do chumbo de substituir o ião cálcio, podendo inibir actividade enzimática ao interagir com proteínas ligando-se aos seus grupos sulfridrilo e, conseqüentemente, inactivando-as. Devido a estas propriedades, vai interferir com a síntese de mielina, a integridade da barreira hematoencefálica, a síntese de colagénio e a permeabilidade vascular. Sendo o cálcio um componente crítico em numerosas funções bioquímicas e metabólicas, ao competir com o cálcio o chumbo vai bloquear a sua entrada para os terminais nervosos, inibir as ATPases dependentes de cálcio, sódio e potássio (afectando o transporte membranar, inibir a utilização do cálcio pelas mitocôndrias diminuindo a produção de energia essencial às funções celulares e interferindo com os receptores de cálcio acoplados a segundos mensageiros). Além disto, o cálcio induz uma mudança conformacional na calmodulina, convertendo-a na sua forma activa; como substituinte do cálcio, o chumbo activa de forma inapropriada a calmodulina, podendo alterar as vias relacionadas com o cAMP. Nas células, o chumbo liga-se a uma variedade de proteínas, algumas das quais têm sido implicadas na sua toxicidade. A formação de corpos de inclusão intranucleares no túbulo proximal renal é uma das características da nefrotoxicidade do chumbo. Por promover a abertura do poro de permeabilidade transitória leva à libertação do citocromo C para o citoplasma activando a morte celular por apoptose ^[5].

O chumbo é, também, um potente inibidor da ácido aminolevulínico desidratase (ALAD), da coproporfirionogénico oxidase e da ferroquelatase, enzimas que catalizam, respectivamente, o segundo, sexto, e último passos da biossíntese do heme para a formação de hemoglobina, provocando anemia ^[5]. Além disto, o chumbo dificulta a libertação e utilização do ferro em eritrócitos imaturos, induzindo um estado de deficiência em ferro. Este processo conduz ao aumento de protoporfirina zinco (ZnPP) em circulação, a qual em situações de insuficiência de ferro, disponibiliza o zinco como um substrato alternativo para a ferroquelatase ^[6], podendo-se associar, em certos casos, a grande presença de eritrócitos com ZnPP à exposição a fontes de chumbo.

Após a absorção, o chumbo é transportado no sangue e depositado nos tecidos (cérebro, fígado, baço, músculos, coração, rins e medula óssea) e nos tecidos mineralizados (ossos e dentes). A excreção é feita, principalmente, através dos rins e o tempo de semi-vida do chumbo no sangue varia entre 28 a 36 dias. Contudo, cerca de 94% do chumbo no organismo encontra-se nos ossos, onde tem um tempo de semi-vida de anos a décadas. O chumbo orgânico pode ser metabolizado a chumbo inorgânico, no fígado, na citocromo P450. O chumbo inorgânico não é metabolizado, no entanto pode conjugar-se com a glutatona. Geralmente a excreção do chumbo

é extremamente lenta o que favorece a sua acumulação no organismo. Devido a isto, durante a gravidez, lactação, menopausa ou em casos de osteoporose, períodos onde ocorre um aumento de reabsorção óssea (perda óssea devido a actividade osteoclástica) regista-se um aumento dos níveis de chumbo no sangue em pessoas que têm quantidades substanciais de chumbo armazenado na estrutura óssea, e isto pode ser uma fonte inesperada de toxicidade por chumbo. A absorção do chumbo depende do estado físico e químico do metal e é influenciada pela idade, estado fisiológico e nutricional, e factores genéticos ^[2].

O chumbo é um dos mais perigosos metais, com maior toxicidade devido à variedade e severidade dos seus efeitos. De uma forma resumida, pode ter efeitos deletérios no sangue, medula óssea, sistema nervoso central e periférico e rins, o que se traduz em condições clínicas tais como em anemia, inapetência (anorexia), encefalopatia, alergia, cefaleias, dificuldade de concentração e memorização, depressão, tonturas, sonolência, fadiga, irritabilidade, cólicas abdominais e dores musculares, dores nos ossos e articulações, diminuição da fertilidade, insuficiência renal, hipertensão, neuropatia periférica e nefropatia crónica ^[2,3,7]. Na população adulta, esforços consideráveis têm sido dispensados no sentido de avaliar o grau e os processos de associação da exposição ao chumbo com os sintomas e as patologias designadas. Além disso, diversos estudos têm contribuído para a compreensão dos efeitos bioquímicos deste metal, podendo facilitar o reconhecimento precoce de alterações significativas e para a suavização de consequências potencialmente adversas.

A IARC (*International Agency for Research on Cancer*) avaliou o potencial carcinogénico do chumbo, concluindo que o chumbo inorgânico possui características carcinogénicas para os humanos, contrastando com o chumbo orgânico para o qual não foi possível estabelecer grau de carcinogenicidade, com base nos estudos levados a cabo em humanos e animais. A exposição ao chumbo tem sido associado com o aumento de risco de cancro dos pulmões, estômago e bexiga. Em estudos com trabalhadores expostos ocupacionalmente a este metal verificou-se danos ao nível cromossomal e DNA, observando-se formação de micronúcleos e aberrações cromossomais, mas nunca com resultados completamente conclusivos ^[8].

Devido aos efeitos nefastos provocados pela exposição a chumbo, e para além de toda a legislação já existente em torno da exposição a elementos adversos ao ser humano a nível ocupacional, uma constante monitorização e rastreio são essenciais para uma melhor qualidade de vida e condições de trabalho. Métodos físicos, bioquímicos, biológicos e moleculares para biomonitorização e diagnóstico têm-se rapidamente desenvolvido nas últimas décadas. O maior desenvolvimento das tecnologias de diagnóstico clínico tem sido direccionado para a análise de bioindicadores do sangue e urina. Na procura de métodos não-invasivos para a avaliação da

exposição individual, surge a possibilidade de diagnóstico baseado na análise de produtos exalados na respiração. Estes métodos estão muito menos desenvolvidos e ainda não são usados com frequência em prática clínica ^[9], mas a possibilidade de um teste de respiração poder constituir uma medida rápida e não-invasiva à exposição individual a poluentes, pode viabilizar estudos de efeitos de poluentes em ambiente industrial, urbano ou outros, abarcando diferentes grupos populacionais, desde trabalhadores a grupos vulneráveis (crianças e idosos).

1.2 Condensado do ar exalado

Poucos tipos de testes de respiração são usados com sucesso como ferramentas de diagnóstico, como é o caso do UBT (*urea breath test*) no diagnóstico de infecção por *Helicobacter pylori* e a medição de óxido nítrico (NO) no diagnóstico de inflamação das vias respiratórias). Contudo, a análise da respiração pode ter muitas aplicações potenciais no diagnóstico clínico de diversas doenças e na monitorização da exposição a poluentes ambientais ^[10]. Nos últimos anos tem havido um aumento significativo no número de trabalhos publicados relativos ao **condensado de ar exalado** (EBC – *exhaled breath condensate*), e a sua popularidade é facilmente compreensível, dado permitir o acesso aos fluidos das superfícies de revestimento pulmonar (ELF – *epithelial lining fluid*) sem ser necessário a indução de muco ou lavagem broncoalveolar (BAL) ^[11], consideradas, respectivamente, técnica semi-invasiva e técnica invasiva, actualmente as utilizadas também na monitorização da inflamação pulmonar. A indução de muco é difícil de obter, implicando desconforto para o paciente, não se conseguindo secreções que sejam representativas dos pulmões como um todo; já o BAL está associado a uma variedade de riscos relativos à anestesia, prejudica a troca gasosa, e pode levar a inflamação e infecção, sendo particularmente arriscado em pacientes com doença pulmonar. Neste contexto, e dada a ausência de métodos não-invasivos, o EBC apresenta-se como um promissor indicador na monitorização da exposição ambiental. A recolha do ar exalado não apresenta desconforto para o indivíduo e não está associado a risco, o que torna este método aliciante, principalmente em faixas etárias infanto-juvenis e idosos ^[12]. O EBC é recolhido em ambiente refrigerado; as recolhas podem ser feitas o número de vezes necessária e é uma técnica pouco dispendiosa a longo prazo, sendo duas das vantagens mais importantes para a sua disseminação e utilização ^[11, 13].

O EBC consiste numa fase gasosa que contém substâncias voláteis, como o óxido nítrico, monóxido de carbono e hidrocarbonetos, e uma fase líquida (o EBC), que contém vapor de água e partículas não voláteis ^[14]. Existem uma série de biomarcadores que já identificados no EBC, incluindo adenosina, amónia, peróxido de hidrogénio, isoprostanos, leucotrienos,

óxidos de azoto, peptídeos, citocinas e vários iões. A concentração destes mediadores pode ajudar a traçar perfis que evidenciem reactividade pulmonar e resposta inflamatória, e até caracterizem doenças pulmonares ^[15]. Contudo, é ainda necessária a resposta a diversas questões metodológicas para esta técnica, tais como a padronização da colheita de amostras e a validação das técnicas analíticas ^[12,16].

1.3 Reactividade pulmonar

O pulmão e as vias respiratórias representam uma via de entrada para diversos poluentes ambientais e ocupacionais, como é o caso do chumbo. A visão tradicional do epitélio pulmonar é de este constituir uma barreira física a substâncias irritantes e nocivas inaladas, através de uma função de propulsão de secreções da zona traqueobrônquica em direcção à faringe. Contudo, é agora claro que este epitélio, além de actuar como uma barreira físico e química, desempenha um papel crucial no desenrolar e no aumento dos mecanismos de defesa, por síntese e libertação de uma variedade de mediadores que causam o processo inflamatório ^[17]. Diversos estudos evidenciam que a inflamação e o stress oxidativo são os primeiros eventos na cascata patofisiológica que leva às doenças respiratórias ^[18] e, como já referido, diversos mediadores implicados nesta cascata de inflamação têm sido detectados no EBC, incluindo citocinas ^[19].

As citocinas são moléculas intercelulares de baixo peso molecular (< 80 kDa) ^[20] que estão, em sentido lato, envolvidas em situações normais de regulação e desempenham um papel essencial na modulação dos processos imunológicos e inflamatórios. As vias respiratórias são particularmente dependentes do bom funcionamento destes processos, uma vez que é uma zona exposta a uma enorme e variada quantidade de alérgenos, tais como substâncias nocivas e partículas durante as trocas gasosas. A inflamação na parte inferior do trato respiratório envolve a coordenação de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias ^[21] assim designadas por estimularem ou inibirem o processo de inflamação. Existe um grande número de citocinas (e a lista continua a aumentar), porém, entre as mais estudadas temos a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 4 (IL-4) interleucina 6 (IL-6), factor de necrose tumoral α (TNF- α) como representantes das pró-inflamatórias, e a interleucina 8 (IL-8) e a interleucina 10 (IL-10) como anti-inflamatórias ^[22].

1.3.1 Interleucina 1 β (IL-1 β) e tumor necrose factor α (TNF- α)

A interleucina 1 (IL-1) é um nome geral para duas proteínas distintas: IL-1 α e IL-1 β . É produzida por macrófagos, monócitos, células detriticas, células T e células tecidulares, sintetizada a partir da Pro-IL-1 β , por clivagem com a enzima Caspase-1 ou *Interleukin-1 Converting Enzyme* (ICE) [5] (figura 1).

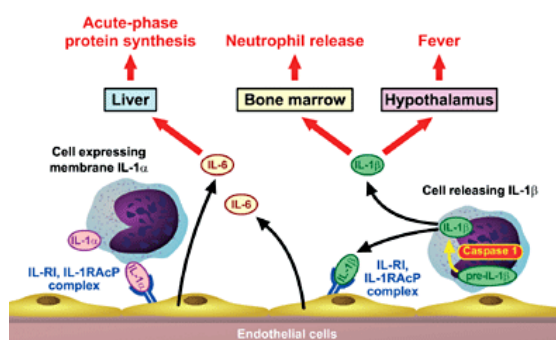


Figura 1 – Síntese e ação da IL-1 β na neutrofilia e febre [23]

O TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. Após ser produzido e libertado, o TNF- α irá ligar-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, para que possa produzir o seu efeito biológico. Os receptores de TNF- α (principalmente o TNF-RII) podem ainda induzir a apoptose [24].

Dentro da enorme complexidade que é o processo inflamatório, estas duas citocinas têm um papel preponderante em diferentes passos da resposta imunológica inata. Na sequência do reconhecimento de agentes externos, a sinalização mediada pelos receptores *Toll-like* (TLR) (família de proteínas transmembranares do sistema imunológico inato, responsáveis pelo reconhecimento de várias vias de padrões de reconhecimento de patógenos) resulta na produção de TNF- α e IL-1 β , sendo o recrutamento dos neutrófilos dependente da produção orquestrada destas duas citocinas. Além disso, ambas vão estimular a expressão de moléculas de adesão vascular nas células endoteliais (ex: E-selectina, P-selectina, ICAM-1, VCAM-1 e MCP-1) [25]. A P e a E-selectinas vão interagir com a L-selectina nos neutrófilos, levando à migração destes para o local da inflamação. Consequentemente e em resposta à sinalização do TNF- α e da IL-1 β os neutrófilos e eosinófilos libertam outras citocinas e factores de adesão e regulação como IL-8, *growth regulated oncogene* (GRO) e *epithelial-derived neutrophil attractant* (ENA)-78. Todas as células nucleadas possuem um receptor funcional para o TNF- α e IL-1 β sugerindo a sua importância no aumento da resposta inflamatória, induzindo todos os principais

componentes celulares da membrana alveolar e das vias respiratórias para participarem neste processo [21].

Existem poucos estudos publicados relativos à medição de citocinas no EBC, embora esta seja uma área promissora de investigação [19].

1.3.2 Óxido Nítrico (NO)

Esta pequena e simples molécula, talvez a menor produzida pelos mamíferos, tem efeitos fascinantes desde a manutenção inicial da vida, através do controlo da circulação placentária, na regulação das contracções uterinas no trabalho de parto ou imunoregulação, como também efeitos letais demonstráveis, por exemplo, no choque séptico [26].

A sua concentração pode ser medida de forma indirecta através dos produtos estáveis derivados de NO (nitrito e nitrato) presentes nos condensados [14]. Outro método que tem sido vulgarizado permite a determinação dos níveis de NO de forma automática. A fracção de óxido nítrico exalado (FeNO) medida pelo NIOX MINO (Aerocrine), um aparelho automático e o único analisador aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) [27] está já estabelecida como um marcador para a inflamação das vias respiratórias [28], sendo o NO considerado o marcador inflamatório mais bem estudado do ar exalado [29]. Este já se encontra difundido a nível clínico, como se observa na figura 2, comparando-o com outros métodos de análise do ar exalado, como o EBC que está ainda em fase de investigação.

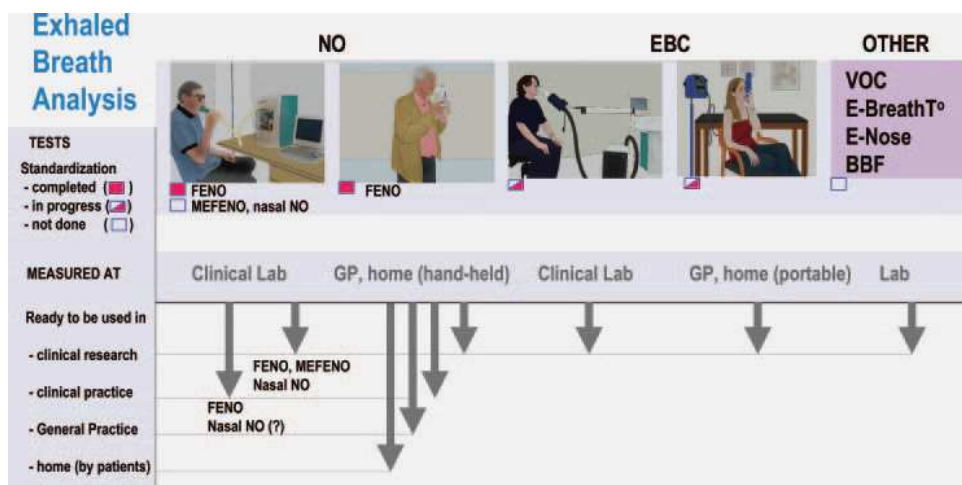


Figura 2 – Análise do ar exalado: comparação entre o estado de padronização para o NO e para o EBC [30].

Vários estudos mostraram que a sua concentração aumenta em condições associadas com a inflamação das vias aéreas. Muitos focam um elevado aumento em casos de asma assim como

outras doenças pulmonares inflamatórias ^[31]. Existe um número limitado de estudos com medições de NO no ar exalado em ambiente ocupacional ^[32], e os que existem abordam a problemática da asma ocupacional ^[32,33], a exposição a bioaerossóis ^[34] em que não se observou efeito nos valores de NO, e a exposição a amónia ^[35] em que se observou um ligeiro aumento nos valores de NO obtidos pelos trabalhadores expostos a este tóxico. Contudo, não há estudos que liguem os níveis de NO exalado com a exposição a metais pesados.

Quanto à sua importância biológica, o NO é um gás com a função de mediador biológico e mensageiro intercelular em animais e humanos. Desempenha um papel chave no interior dos pulmões e vias respiratórias na modulação de uma grande variedade de funções incluindo a resposta inflamatória ^[14]. Nos pulmões, actua como vasodilatador e broncodilatador. Este composto é formado a partir do aminoácido semi-essencial L-arginina (por desaminação), aquando a sua transformação em L-citrulina, reacção mediada pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS). Pelo menos três tipos de isómeros da NOS estão identificados: dentre as isoformas chamadas constitutivas (cNOS) temos a encontrada nas células endoteliais (tipo I ou eNOS) e a neuronal (tipo III ou nNOS). O terceiro tipo de isómero, chamado indutível ou tipo II (iNOS), que ao contrário das isoformas constitutivas, quando activada em vários tipos celulares como resposta a estímulos inflamatórios, leva à produção de NO em grandes quantidades ^[10, 27, 36]. É sugerido que quantidades muito pequenas (na ordem dos picomolares) de NO sintetizado endogenamente pelas isoformas cNOS são importantes para a manutenção da homeostasia fisiológica, actuando como regulador fisiológico por relaxamento dos músculos lisos, mantendo o calibre brônquico, regulando a frequência dos movimentos ciliares ^[26] ou através da sua função como neurotransmissor. Pelo contrário, NO é excessivamente produzido (quantidades nanomolares) através da iNOS é responsável pela defesa imunológica a agentes externos inalados, principalmente pelo recrutamento de macrófagos epiteliais e subepiteliais. Isto é configurado pela queda da resistência às infecções broncopulmonares com administração de análogos de L-arginina *in vitro* e *in vivo* ^[37]. Contudo uma elevada concentração pode levar a um estado crítico de inflamação das vias respiratórias e causar danos no epitélio pulmonar ^[17], sendo por isso considerado uma “faca de dois gumes”. Os estímulos que activam a iNos incluem citocinas pró-inflamatórias ou o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ^[27]. As citocinas como o TNF- α , interferão-gama (IFN- γ) e a IL-1 β aumentam a expressão da NOS *in vitro*; culturas de células alveolares pulmonares *epithelium-like* demonstraram actividade basal das cNOS e, sob estímulo de IFN- γ isolado ou juntamente com IL-1 β mais TNF- α , observou-se produção de RNA-mensageiro da isoforma iNOS ^[38]. O NO produzido por uma grande variedade de células como as células epiteliais, as células nervosas, as células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, mastócitos) e as células endoteliais.

Em geral, os estudos mostram que os níveis de NO exalado para os indivíduos saudáveis adultos encontram-se entre os 5 ppb e os 35 ppb, se medido de acordo com as linhas gerais da ATS/ERS [15].

2. OBJECTIVOS

Pretendeu-se avaliar a resposta das vias respiratórias à exposição a poluentes em ambiente industrial, mais concretamente a fumos e partículas de chumbo, pela detecção de citocinas e óxido nítrico (NO) no ar exalado.

Para atingir este objectivo avaliaram-se:

- Metodologias para a determinação quantitativa de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no condensado do ar exalado (EBC) por ELISA;
- As variações da concentração de NO exalado em grupos de indivíduos expostos e não expostos.

O EBC é uma matriz biológica promissora, obtida por métodos não invasivos, mas ainda não validada para parâmetros inflamatórios. Espera-se poder obter resultados que nos permitam avançar na validação e optimização das metodologias de análise de citocinas. Relativamente ao NO, não existem estudos que relacionem os seus níveis com a exposição ocupacional a metais pesados, embora o NO seja um bioindicador de inflamação pulmonar, vulgarmente utilizado na prática clínica.

Estudar-se-ão as inter-relações dos níveis de citocinas no EBC, dos níveis de NO exalado, dos dados clínicos e antropométricos e outros bioindicadores de exposição dos indivíduos expostos de modo a estimar a utilidade destes indicadores na biomonitorização em ambiente ocupacional.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Grupos e desenho do estudo

A amostragem deste trabalho é constituída por três grupos: dois grupos de indivíduos expostos a chumbo (grupo A e grupo B) e um grupo controlo. Os grupos de indivíduos expostos são formados por trabalhadores de duas fábricas: 19 trabalhadores da fábrica A (fundição de chumbo) e 33 trabalhadores da fábrica B (fabrico de baterias), escolhidos sem nenhum critério prévio, de forma a ter uma amostragem aleatória de cada local. Para cada indivíduo foi feita uma ficha pessoal com as seguintes informações: sexo, idade, anos de trabalho na fábrica (antiguidade), hábitos/histórico tabágico e histórico alérgico. Por sua vez, o grupo controlo é composto por 19 voluntários do ITN para os quais foram reunidas as mesmas informações, exceptuando a antiguidade.

Foram recolhidas amostras de EBC e medido o óxido nítrico exalado a todos os trabalhadores e voluntários. Para o grupo A foi realizada uma avaliação médica de observação e análise da função pulmonar, bem como pedido os últimos valores de chumbo no sangue e calculado o índice de massa corporal (IMC).

Todos os trabalhadores/voluntários foram devidamente informados dos objectivos do projecto, do tipo de recolha e análises a serem feitas, bem como do fim a que se destinavam.

3.2 Avaliação médica

Os trabalhadores do grupo A foram sujeitos a uma avaliação médica, realizada por médicos pneumologistas do Hospital de Santa Maria (Lisboa), colaboradores do projecto. Para avaliação da função pulmonar, foram realizados testes de espirometria com o DATOSPIR-120 (Sibelmed, Barcelona, Spain) tendo-se determinado os seguintes parâmetros: FVC, FEV₁ e FEF50%. O teste foi feito duas vezes e escolhidos os valores mais altos. Foi *a priori* considerada uma função pulmonar normal com valores de FEV₁ ≥ 80% e com a razão FEV₁/FVC ≥ 70% [18]. Os indivíduos foram também examinados para despiste de sintomas alérgicos ou do foro respiratório (pieira, tosse, dispneia, espirros), e retirada a altura e o peso para determinação do IMC.

3.3 Caracterização do ambiente de trabalho

Foram realizadas amostragens do material particulado suspenso no ar (APM- *air particulate matter*) na fábrica A, dentro do instituto de investigação onde trabalham os indivíduos do grupo controlo (ambiente designado de *indoor*) e em ambiente *outdoor* na zona geográfica dos 3 locais de trabalho. Para tal foram colocados quatro amostradores no interior da fábrica e nos outros dois ambientes. Os amostradores utilizados são de baixo-volume do tipo Gent, constituídos por 2 andares, com dois filtros de policarbonato Nucleopore de 47mm de diâmetro. Estes amostradores foram equipados com um pré impactador para selecção das partículas inferiores a 10 µm de diâmetro aerodinâmico (PM₁₀). O ar foi recolhido para um fluxo de 15-16 L.min⁻¹, permitindo recolher partículas com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 e 10µm na primeira etapa, e partículas com diâmetro inferior a 2,5 numa segunda etapa. A recolha das partículas fez-se por filtração e a sua massa foi determinada por gravimetria. Foi realizada a determinação elementar por PIXE e INAA.

Para além desta amostragem, indivíduos de grupo A, escolhidos aleatoriamente, usaram amostradores pessoais durante um turno inteiro para se quantificar o valor de exposição total a particulado durante um horário normal de trabalho. De forma a simular a exposição real dos trabalhadores ao agente em estudo, a amostragem foi realizada na zona de respiração dos trabalhadores.

3.4 Recolha de EBC

A recolha de todas as amostras de EBC neste estudo foi feita com o equipamento EcoScreen[®] (Jaeger, Wurzburg, Germany), um aparelho de recolha do ar exalado com um sistema de refrigeração eléctrica que condensa o ar libertado, armazenando-o em fase líquida no tubo de recolha. Na entrada no aparelho é inserido a peça com duas válvulas-filtro unidireccionais em forma de “T” juntamente com o tubo de refrigeração (material não-descartável) onde se inserem o bucal e o tubo de recolha (material descartável) (figura 3).

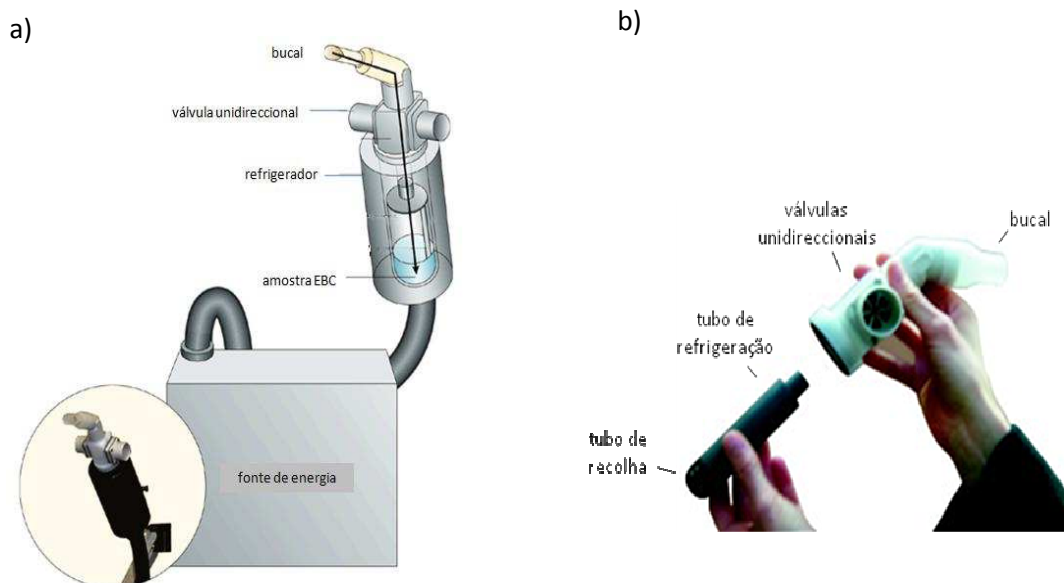


Figura 3 – Aparelho de recolha de EBC: a) desenho esquemático do EcoScreen (adaptado de [39]); b) material descartável e não descartável usado no EcoScreen (adaptado de [40])

Os tubos de recolha são previamente lavados com HNO_3 suprapuro (>20% v/v), passados abundantemente por água destilada (Milli-Q Element System, Milipore) e secos numa câmara de fluxo laminar. O material descartável é usado apenas por um indivíduo e o não descartável é desinfetado em lixívia (cerca de 2 horas) com posterior limpeza com água destilada e etanol, após cada utilização. Todo o material é levado para o local de recolha em sacos de plástico para evitar contaminações.

A recolha consiste no seguinte: o indivíduo sentado comodamente, deve respirar durante 15 minutos ao seu ritmo respiratório normal para o bucal do aparelho. Para que a respiração seja feita só oralmente, de forma a minimizar a entrada directa de ar através do nariz é utilizada uma pinça nasal. O tempo de recolha de 15 minutos corresponde a um volume de 1-4 ml de condensado. As amostras recolhidas são repartidas por 4 tubos *ependorf* devidamente identificados, constando o volume e o fim a que se destinam. Todas as recolhas dos grupos A e B foram feitas nas enfermarias das respectivas fábricas, ou seja, em ambiente controlado. A recolha de EBC do grupo controlo foi realizada em laboratório limpo, dentro da instituição. As amostras foram transportadas em suportes adequados dentro de uma caixa térmica com gelo e armazenadas a temperaturas inferiores a -20°C .

3.5 Medição do óxido nítrico exalado

Os níveis de NO no ar exalado foram medidos através do NIOX MINO (Aerocrine, Solna, Sweden) (figura 4). Antes da medição, o software do aparelho verifica se os níveis de estabilidade, temperatura e ruído estão dentro dos limites pré-estabelecidos para garantir

precisão nas medições. Para se efectuar a medição o indivíduo tem de exalar esvaziando os pulmões, colocar a boca no bucal no aparelho e inspirar a partir do aparelho até se atingir a capacidade pulmonar total (para garantir o fecho do palato) e, em seguida, expirar de forma lenta e constante para dentro do bucal durante 10 segundos, sendo a expiração assistida por sistema de feedback visual e áudio do aparelho, ajudando na manutenção de uma pressão constante durante toda a expiração. O valor de óxido nítrico exalado é expresso em partes por bilião (ppb). Foi realizada apenas uma medição por indivíduo, e utilizado o valor obtido.



Figura 4 – Aparelho automático de medição de NO exalado, NIOX MINO (adaptado de [41])

3.6 Determinação das concentrações de citocinas no EBC

Para determinar as concentrações das citocinas foi usado o método ELISA, uma análise quantitativa que emprega um ensaio imunoenzimático em “sandwich”. De uma forma resumida, esta técnica consiste no seguinte: anticorpos monoclonais específicos de citocina pré-revestidos são colocados dentro da placa, nos diversos poços a usar. Os padrões e as amostras em estudo são pipetadas para os poços e qualquer citocina presente fica ligada ao anticorpo imobilizado. Depois da lavagem, que vai retirar todas as substâncias que não se ligaram, anticorpos policlonais ligados a enzimas específicos para essa citocina são adicionados aos poços. De seguida, efectua-se novamente uma lavagem para separar o reagente anticorpo-enzima que não se ligou, e adiciona-se uma solução substrato. Após isto, a intensidade de cor desenvolvida pela acção enzima-substrato é proporcional à quantidade de citocina que ficou retida no passo inicial, podendo ser medida através de espectrofotometria. Cada padrão e amostra foram analisados em duplicado. Para o cálculo das concentrações estabelece-se uma curva de calibração, em que a média das absorvâncias padrão fique no eixo dos Y, e as concentrações no eixo dos X. O cálculo da concentração baseia-se na média de duplicados de amostra, após a subtracção da média da densidade óptica padrão (“branco”). Todas as amostras de EBC testadas tinham pouco

tempo de congelação desde a sua recolha e foram descongeladas apenas uma vez aquando a realização dos testes.

De notar que em ambos os kits foram usados tubos de polipropileno, de forma a reduzir a adesão de proteínas e marcadores inflamatórios.

3.6.1 Determinação da concentração de IL-1 β por ELISA

Para determinação da IL-1 β humana no EBC foi usado o kit de análise *Human IL-1 β Quantikine HS* (R&D Systems, Abingdom, United Kingdom). O limite de detecção deste kit para esta citocina é de 0,023 pg/ml.

O kit incluía os seguintes reagentes:

- 1) amostra padrão de IL-1 β (liofilizada) para reconstituir em água na concentração de 80 pg/ml a partir da qual se estabelece a curva de calibração do dia;
- 2) solução de diluição do padrão de IL-1 β para preparação das soluções de calibração com de concentrações decrescentes de IL-1 β (diluyente de calibração);
- 3) diluyente para as amostras;
- 4) tampão de lavagem;
- 5) substracto liofilizado (NADPH liofilizado) e respectiva solução de diluição;
- 6) enzimas de amplificação (liofilizado) e respectiva solução de diluição;
- 7) solução de paragem de reacção (ácido sulfúrico 6N).

Para cada ensaio efectuou-se uma curva de calibração com concentrações de IL-1 β de 0,125 pg/ml a 8 pg/ml. Cada amostra (padrões e amostras desconhecidas) foi preparada em duplicado e as absorvâncias lidas a 490 e 650nm no espectrofotómetro (Cary 50 Bio UV-visible, Varian). O protocolo utilizado encontra-se no Anexo1.

O ajuste das curvas de calibração foi elaborado com o software ORIGIN 6.0 (Microcal Software, Inc). Os valores de concentração foram obtidos a partir da função de ajuste que relaciona a absorvância obtida com a concentração, por cálculo directo ou interpolação. O cálculo da concentração de IL-1 β em cada amostra foi efectuado com base nos duplicados após subtracção do branco da curva de calibração.

Validação do método ELISA

Uma vez que a matriz do EBC não faz parte das matrizes validadas para este método (no caso deste kit: sangue, soro e cultura de células), tivemos de proceder a um protocolo de validação da matriz, aconselhado pelo fabricante. A validação da determinação da IL-1 β na matriz do EBC é essencial, permitindo demonstrar a precisão do método e otimizar o procedimento experimental.

A validação do método consistiu em dois testes: um teste de recuperação e um teste de linearidade.

Foi ainda testada a sensibilidade do método em paralelo com os testes de recuperação em amostras pré-concentradas por liofilização. A liofilização das amostras fez-se a partir de alíquotas de EBC congeladas (Edwards Modulyo EF4, Sussex, England). Após a liofilização as amostras foram armazenadas a < -20 °C até realização da experiência. No dia do teste ELISA, as amostras liofilizadas foram reconstituídas para um volume de água destilada 2x inferior ao do EBC (concentrando as amostras em 2x).

Para efeitos de comparação com uma matriz validada pelo fabricante para o kit ELISA, determinaram-se as concentrações de IL-1 β em três amostras de soro humano, das quais duas pertenciam a indivíduos saudáveis e uma a um indivíduo com doença coronária.

A validação da matriz de EBC foi efectuada em dois ensaios, tendo-se armazenado os reagentes de acordo com as indicações do fabricante. O período de tempo que decorreu entre os dois ensaios foi de 15 dias, inferior ao limite de tempo de armazenamento dos reagentes do kit (validade de 1 mês a -20°C).

1) Teste de recuperação

O teste de recuperação consistiu em adicionar uma quantidade conhecida de IL-1 β , neste caso uma solução preparada a partir do padrão de IL-1 β do kit, nas amostras de EBC e em soluções de controlo, em que haja garantia da ausência de IL-1 β . A recuperação é calculada relativamente à quantidade de IL-1 β adicionada e expressa em percentagem:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{concentração de IL1}\beta \text{ obtida} - \text{concentração de IL1}\beta \text{ adicionada})}{\text{concentração IL1}\beta \text{ adicionada}} \times 100$$

Se houver recuperação total (100%) a concentração detectada deverá ser igual (no caso da amostra não conter IL-1 β) ou superior (no caso da amostra conter IL-1 β) à quantidade adicionada.

Os ensaios de recuperação foram efectuados em amostras de EBC sem tratamento prévio e pré-concentradas por liofilização. Como amostra controlo utilizou-se como solução de diluição o diluente de calibração.

Foram utilizadas duas soluções de IL-1 β para dopagem das amostras de EBC e controlo: 0,8 pg/ml e 80 pg/ml, e a descrição dos volumes utilizados para cada uma das concentrações encontra-se, respectivamente, na tabela 1 e na tabela 2 (1 $^{\circ}$ e 2 $^{\circ}$ ensaio)

Tabela 1 – Descrição dos volumes utilizados dos reagentes e das três amostras, para a dopagem com a solução de 0,8 pg/ml.

	amostra controlo	EBC nativo	EBC dopado
volume de solução dopante de IL-1β (μl)	20	-	20
volume de solução de diluição (μl)	980	-	-
volume de EBC (μl)	-	1000	980
volume final (μl)	1000	1000	1000

Neste ensaio, a adição da solução do padrão nas amostras dopadas e controlo devem ser seguidas uma ligeira agitação no vortéx. A concentração acrescentada às amostras de EBC dopado e controlo foi de 0,016 pg de IL-1 β .

Tabela 2 – Descrição dos volumes utilizados dos reagentes e de amostras, para a dopagem com a solução de 80 pg/ml.

	amostra controlo	EBC s/tratamento		EBC pré-concentrado	
		EBC nativo	EBC dopado	EBC nativo	EBC dopado
volume de solução dopante de IL-1β (μl)	20	-	20	-	20
volume de solução de diluição (μl)	480	-	-	500	480
volume de EBC (μl)	-	500	480	1000	960
volume final (μl)	500	500	500	500	500

A solução de diluição para as amostras foi água destilada, e para a amostra controlo foi utilizado igualmente o diluente de calibração. A concentração de IL-1 β adicionada com os 20 μ l para um volume final de 500 μ l foi de 3,2 pg/ml. A quantidade de amostras analisadas foi a seguinte:

- 2 amostras de EBC nativo;
- 2 amostras de EBC pré-concentrado 2x;
- 4 amostras de EBC dopado;
- 2 amostras de EBC pré-concentrado dopado;
- 1 amostra controlo dopada.

2) Teste de linearidade

O teste de linearidade consistiu na diluição de 1:2 das amostras controlo e de EBC sem pré-concentração, nativa e dopada (ver tabela 1). Se a concentração de IL-1 β medida na amostra não se apresentar linear entre diluições, isto indica que um componente está a interferir na detecção do analito. Diluíram-se amostras de controlo e de EBC na proporção de 1:2 v/v em diluente de calibração (0,5ml de amostra em 0,5ml de diluente calibrador). Após a diluição levaram-se as amostras ligeiramente ao vórtex.

3.6.2 Determinação da concentração de TNF- α por ELISA

Para se fazer a determinação das concentrações desta citocina no EBC foi igualmente usado o método de ELISA com kit de análise *Human TNF- α Quantikine HS* (R&D Systems, Abingdom, United Kingdom), que possui um limite mínimo de detecção de 0,038 pg/ml.

Os reagentes do teste incluíam, tal como no kit da IL-1 β (ver 3.6.1) amostra padrão de TNF- α (liofilizada) para reconstituir em água na concentração de 80 pg/ml a partir da qual se estabelece a curva de calibração do dia e solução de diluição do padrão de TNF- α para preparação das soluções de calibração com de concentrações decrescentes do analito.

Para a medição do TNF- α no EBC as amostras foram pré-concentradas de forma a tentar garantir a detecção desta citocina no EBC. Para tal, testaram-se amostras pré-concentradas 4 e 10 vezes, tal como referido por Tufvesson *et al* ^[42], que devido aos baixos níveis destas moléculas no EBC concentraram as suas amostras até 10 vezes, para serem testadas com este mesmo kit de análise. As amostras foram liofilizadas (Edwards Modulyo EF4, Sussex, England), e armazenadas a -80 °C até serem realizados os testes ELISA. O kit de ELISA para o

TNF- α possui os mesmos reagentes que o anterior, a única diferença é relativa à curva de calibração que possui concentrações padrão de 0,5 pg/ml a 32 pg/ml. A realização destes testes decorreu em dois ensaios distintos para os quais se estabeleceram duas rectas de calibração independentes. O período de tempo entre os dois ensaios foi de 28 dias, inferior ao limite de tempo de armazenamento dos reagentes e substratos do kit, garantindo as condições de temperatura (-20 °C) recomendadas pelo fabricante. Não foi realizada nenhuma alteração no procedimento do método (Anexo 2).

Para além da liofilização a 4 e 10 vezes, foram também efectuados testes de recuperação dopando amostras com uma quantidade conhecida de TNF- α , à semelhança do efectuado para a determinação de IL-1 β (ver 3.6.1). A solução de dopagem foi preparada a partir do padrão de TNF- α fornecido no kit e usado para estabelecer a recta de calibração. Para além do factor concentração foi estudado o efeito de matriz. Para tal ressuspenderam-se as amostras liofilizadas, em diluente de calibração e tampão PBS (*phosphate buffered saline*), uma vez que o diluente de calibração simula a matriz para qual é efectuada a recta de calibração e PBS actua como um inibidor, pois ao conter fosfato inorgânico vai inibir a fosfatase alcalina e poderá dar-nos informação sobre a interferência de iões inorgânicos (que existem no EBC) nas reacções enzimáticas na detecção do TNF- α . As amostras utilizadas no teste encontram-se resumidas na tabela 3.

Tabela 3 – Descrição dos volumes de reagentes e amostras utilizadas nos ensaios para determinação de TNF- α nas amostras de EBC.

	EBC sem tratamento		EBC pré-concentrado				
	EBC nativo	EBC nativo liofilizado	4x	10x			
			EBC nativo	EBC nativo	EBC dopado		
volume de solução dopante de IL-1β (μl)	-	-	-	-	-	50	50
volume de solução de diluição (μl)	-	450	440	450	450	400	450
solução de ressuspensão	-	D.C.	PBS	PBS	D.C.	PBS	D.C.
volume de EBC (μl)	450		4400	4500	4500	4000	4500
volume final (μl)	450		440	450	450	450	500

D.C. – diluente de calibração

Foram usadas duas amostras de EBC nativos sem tratamento (EBC nativo 1 e EBC nativo 2).

As amostras liofilizadas dopadas, ressuspendidas em diluente de calibração e PBS, tiveram a adição de 50 µl de solução padrão que corresponde a uma concentração de 3,2pg/ml e 4 pg/ml, respectivamente, devido aos diferentes volumes finais usados. Após adição do padrão as amostras foram levadas ligeiramente ao vórtex. A recuperação foi calculada:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{concentração de TNF}\alpha \text{ obtida} - \text{concentração de TNF}\alpha \text{ adicionada})}{\text{concentração TNF}\alpha \text{ adicionada}} \times 100$$

Foram também utilizadas duas amostras de soro (soro 4 e soro 5) para efeitos de comparação de uma matriz validada pelo fabricante (soro) e a matriz não-validada do EBC. O soro 4 pertencia a um indivíduo saudável e o soro 5 a um indivíduo com doença coronária.

3.7 Análise estatística

As variáveis foram analisadas relativamente à sua normalidade pelo teste de *Shapiro-Willks* e a sua heterogeneidade pelo teste de *Levene*. As diferenças entre os grupos foram estudadas pelo teste de *Kruskal-Wallis*, e a única variável normal e que apresentava heterogeneidade por ANOVA.

Entre as diferentes variáveis foram estabelecidas correlações usando o coeficiente de *Spearman* e o coeficiente de *Pearson*, consoante a sua normalidade, e os resultados estatísticos foram considerados significativos com um $p < 0,05$. O software utilizado foi o SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Para a realização dos gráficos foi usado o software ORIGIN 6.0 (Microcal Software, Inc).

4. RESULTADOS

A recolha de EBC foi realizada nos três grupos de estudo, grupo A, grupo B e grupo controlo. Também para os 3 grupos foi realizada a medição dos níveis de óxido nítrico e a caracterização antropométrica. A avaliação clínica e a caracterização do ambiente de trabalho foram feitas para o grupo A.

Foram realizados testes para a determinação quantitativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em EBC por ELISA, IL-1 β e TNF- α , e perante os baixos resultados iniciais tentativas de optimização deste método para esta nova matriz.

4.1 Caracterização dos grupos

As características demográficas dos três grupos de estudo e as informações obtidas durante o inquérito sumário para os indivíduos, relativamente à idade, anos de exposição e hábitos tabágicos encontram-se expressas na tabela 4. Os anos de exposição correspondem aos anos de trabalho na respectiva fábrica, em que há exposição ao metal pesado. Esta variável não é, por isso mesmo, utilizável para o grupo controlo.

Tabela 4 – Características demográficas para o grupo A, grupo B e grupo controlo obtidas durante o inquérito sumário realizado aquando a recolha do EBC.

características	grupo A	grupo B	grupo controlo	p-value
indivíduos, n	19	33	19	
idade, anos *	39,5 \pm 7,9	42,3 \pm 10,1	37,3 \pm 8,8	0,164 ^a
min-máx	24 - 58	25 - 63	25 - 55	
género masculino, n (%)	19 (100%)	20 (60,6%)	11 (57,9%)	0,006 ^b
exposição, anos *	10,9 \pm 8	14,9 \pm 10,2	-	0,195 ^b
min-máx	2 - 23	4 - 39		
hábitos tabágicos				
fumador, n (%)	13 (68,4%)	16 (42,4%)	7 (36,8%)	0,713 ^b
não-fumador, n (%)	6 (31,6%)	17 (57,6%)	12 (63,2%)	

* os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.
^a teste ANOVA
^b teste de Kruskal-Wallis

O grupo A e o grupo controlo possuem o mesmo número de indivíduos. A idade é muito homogénea entre os três grupos, bem como os anos de exposição entre os dois grupos de trabalhadores fábric. Em relação à percentagem do género masculino, o grupo A é totalmente constituído por homens, e no grupo B e o grupo controlo cerca de 60% são do sexo masculino.

4.2 Caracterização do ambiente de trabalho

Foi realizado o controlo da qualidade do ar para a fábrica A, para o ambiente *indoor* do grupo controlo e em ambiente *outdoor*. Na fábrica B, embora previsto, não foi possível fazer este tipo de estudo em tempo útil, por questões de agendamento. Os amostradores utilizados foram do tipo estático que permitem separação de duas fracções granulométricas: < 2,5 µm e de 2,5 a 10 µm de diâmetro aerodinâmico. A análise do particulado em suspensão tem em conta esta granulometria, uma vez que corresponde à das fracções inaláveis inferiores a 10µm de diâmetro aerodinâmico. Os resultados obtidos para a quantidade de particulado suspenso no ar, nos três ambientes em estudo podem ser observadas no gráfico da figura 5.

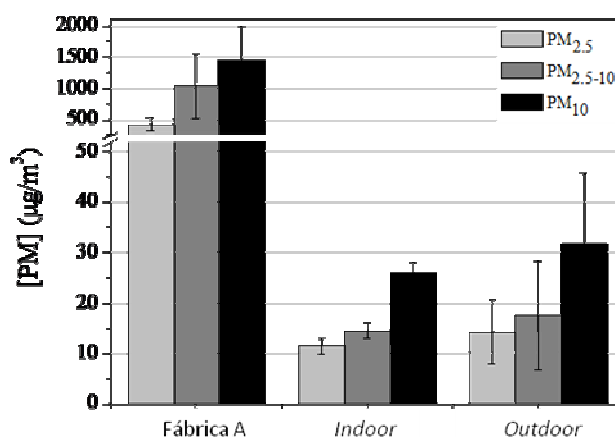


Figura 5 – Média das concentrações de material particulado (PM) suspenso no ar recolhido na fábrica A, em ambiente *indoor* e ambiente *outdoor*, nas três escalas de diâmetro.

Verifica-se que a fábrica A possui níveis de concentração elevados de diferente granulometria de partículas comparativamente com os outros dois ambientes, embora não exceda o valor limite de partículas na fracção respirável de < 10µm de diâmetro aerodinâmico (3mg/m³) estabelecido pela norma portuguesa NP 1796:2007 que estabelece os limites de exposição ocupacional para agentes químicos. Especificamente para o chumbo, a figura 6 representa as concentrações deste elemento nos três ambientes.

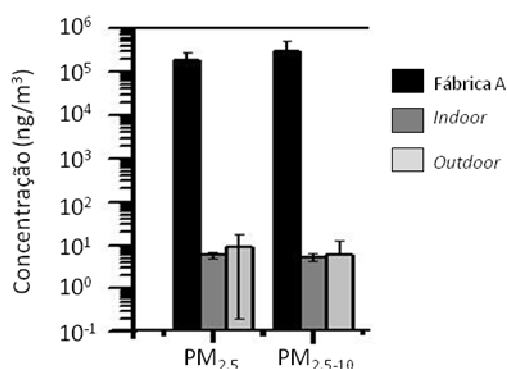


Figura 6 – Concentrações de partículas de chumbo, nas duas escalas de dimensão, nos três ambientes estudados.

Como seria de esperar o ambiente fabril possui, comparado com os outros dois, uma elevada concentração de particulado de chumbo, tendo sido o elemento com maiores concentrações obtidas nas amostras recolhidas, seguido de sódio, cloro, ferro e antimónio, todos eles elementos associados com o processo fabril e as matérias primas utilizadas na fábrica A.

Foi também efectuado o controlo de qualidade do ar na fábrica A, recorrendo-se a amostradores pessoais usados por alguns dos trabalhadores envolvidos em processos específicos. Todos os valores obtidos para a exposição ocupacional ao chumbo nos trabalhadores avaliados encontravam-se acima do valor limite de exposição de 0,15 mg/m³ estipulado pela norma portuguesa NP1796:2007, o que foi comunicado à administração da empresa para que se tomassem pudessem introduzir medidas de mitigação adequadas.

4.3 Recolha de EBC

A recolha do EBC foi realizada para os indivíduos dos três grupos. Os valores médios de EBC recolhido obtidos para cada grupo encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Médias dos volumes de EBC recolhidos para o grupo A, grupo B e grupo controlo.

	grupo A (n=19)	grupo B (n=33)	grupo controlo (n=19)	p-value ^a
média EBC recolhido (µl) *	2267,1 ± 320,4	2362,6 ± 543,2	2247,9 ± 364,4	0,805
min – máx (µl)	1752 – 2775	1300 - 3675	1230 - 2900	

* os dados encontram-se expressos em média ± desvio padrão

^a teste de Kruskal-Wallis (p<0,05 considerado significativo)

Embora com valores limite de mínimo e máximo de volume de EBC obtido para cada grupo um pouco distintos entre si, as médias para os três grupos não apresentam diferença significativa.

4.4 Avaliação clínica

Na avaliação clínica recorreu-se à espirometria para avaliar a função pulmonar. Só se conseguiu realizar esta avaliação na fábrica A, embora o mesmo estivesse agendado para a fábrica B mas não foi possível a sua realização em tempo útil. Dos 19 trabalhadores do grupo A foi feita a avaliação a 14 trabalhadores, uma vez que alguns já não exerciam funções na fábrica na altura da avaliação clínica. Foram pedidos os valores de Pb no sangue registados nas últimas análises, para cada trabalhador. Estes dados foram obtidos para 11 trabalhadores do grupo A. Embora não tenha sido realizada os testes de espirometria para o grupo B, foram recolhidos os valores de Pb no sangue para 18 trabalhadores (tabela 6).

Tabela 6 – Resultados dos diferentes parâmetros espirométricos e IMC para o grupo A obtidos durante a avaliação médica, e níveis de chumbo no sangue para o grupo A e B.

	grupo A (n=14)	grupo B (n=18)
Pb no sangue (µg/dl)	42,92 ± 15,91 ^a	21,56 ± 8,87
FEV1 (%)	104,71 ± 16,07	-
FVC (%)	97,21 ± 29,08	-
FEV1/FVC (%)	102,86 ± 5,92	-
FEF₅₀ (%)	102,57 ± 23,63	-
IMC	26,82 ± 3,52	-

FEV1(%) – volume expiratório forçado num segundo
FVC(%) – capacidade vital forçada
FEF₅₀ – fluxo expiratório força a 50% da expiração

Todos os dados se encontram expressos em média ± desvio padrão
^a resultados obtidos só para 11 dos indivíduos do grupo.

Os níveis de chumbo no sangue obtidos para os trabalhadores do grupo A encontram-se em média nos 43 µg/dl, com valores mínimo e máximo de, respectivamente, 15,1 µg/dl e 64,1 µg/dl, que embora sejam valores altos não ultrapassam o valor limite de 70 µg/dl, estipulado pela norma portuguesa NP 1796:2007. Em relação os níveis para o grupo B, são bastante inferiores aos da fábrica A, com uma média de 22 µg/dl e com valores mínimos e máximos de 9 µg/dl e 35 µg/dl. Isto expressa adequadamente as condições que foram observadas nos dois locais fabris; embora não se tivesse realizado a caracterização do ambiente de trabalho para a fábrica B, verificou-se *in situ* melhores condições de trabalho e maior cuidado e uso das medidas preventivas na exposição a este metal pesado, comparativamente com a fábrica A. Os

indivíduos do grupo controlo não possuem este dados relativamente aos níveis de chumbo no sangue, pelo que não há comparação com o grupo controlo para este parâmetro. No entanto há níveis de chumbo na população da área do local de trabalho do grupo controlo publicados na literatura, com valores muito inferiores aos registados nos trabalhadores de ambas as fábricas, embora vão de 2,0 a 48,0 µg/dl, a média ronda os 7,8 µg/dl [43].

Em relação às variáveis espirométricas para o grupo A, e tendo-se considerado como função pulmonar normal valores de FEV₁ ≥ 80% e a razão FEV₁/FVC ≥ 70%, todos os indivíduos deste grupo apresentaram valores normais tendo sido os valores limite para o FEV₁ de 79% e 132%, e para a razão FEV₁/FVC de 96% e 113%.

4.5 Determinação de óxido nítrico exalado

O NO exalado foi medido nos três grupos em estudo para se testar a possibilidade do seu uso como indicador de exposição ocupacional. Uma vez que este aparelho é utilizado no controlo de asma e doenças alérgicas, na altura da medição foi-lhes questionado a presença de alguma doença alérgica ou de alergias pontuais. Os valores obtidos para o NO encontram-se na tabela 7. A medição só foi possível para 14 indivíduos do grupo A e 28 do grupo B, devido a alguns destes trabalhadores já não se encontrarem de serviço e a problemas no aparelho aquando algumas medições.

Tabela 7 – Valores de NO exalado para os três grupos de estudo e número de indivíduos com histórico alérgico

	grupo A (n=14)	grupo B (n=28)	grupo controlo (n=19)	p-value ^a
NO (ppb)*	19,86 ± 13,94	14,78 ± 10,55	18,47 ± 10,93	0,355
min – máx	6 - 46	5 - 64	6 - 61	
Histórico alérgico	2 (14,3%)	4 (14,3%)	5 (26,3%)	0,438
* os dados estão expressos em média ± desvio padrão.				
^a teste de Kruskal-Wallis (p < 0,05 considerado significativo)				

A diferença entre os três grupos para os valores de NO exalado não é significativa, observando-se valores médios muito próximos (figura 7).

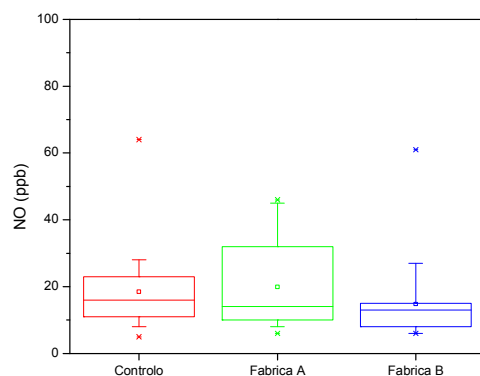


Figura 7 – Comparação entre os níveis de NO no ar exalado (em ppb) para os três grupos em estudo: grupo controle, grupo A e grupo B.

Para melhor diferenciar as situações inseridas como histórico alérgico e a sua expressão ao nível de NO exalado, encontram-se na tabela 8 os sintomas apresentados e o seu reflexo no aumento dos níveis de NO.

Tabela 8 – Doenças/sintomas alérgicos apontados, e valores e médias de NO exalado correspondentes, para os indivíduos de todos os grupos.

situação	n	NO (ppb)	média NO (ppb)
asma controlada	1	11	-
sinusite	2	13; 26	19,5
alergias pontuais (ex. pólen)	4	19; 21; 27; 61	32
rinite	4	26; 36; 45; 64	42,8

Como se verifica no gráfico da figura 8, existe uma grande diferença dos valores de NO obtidos para os indivíduos que apresentaram as queixas alérgicas referenciadas em cima.

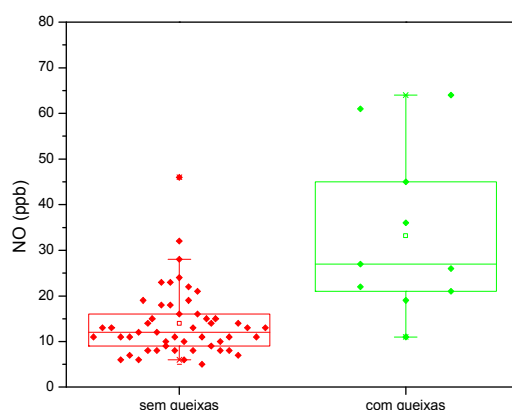


Figura 8 – Diferença para níveis de NO exalado (em ppb) entre os indivíduos que apresentaram queixas alérgicas e os que não apresentaram, durante a avaliação médica.

4.6 Determinação da concentração de citocinas no EBC

Foram medidos os níveis de duas citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , em amostras de EBC. O EBC é uma matriz não validada para o método ELISA, de forma a que se iniciou a pesquisa por uma validação da matriz. Posteriormente, e uma vez que estes níveis são muito baixos, fizeram-se testes para avaliar a necessidade de pré-concentração e o efeito matriz na qualidade dos resultados.

4.6.1 Determinação da concentração de IL-1 β no EBC

No ensaio de validação da matriz de EBC, foram determinadas as concentrações de IL-1 β nas amostras de EBC nativo, dopado, controlo e nas suas respectivas diluições de 1:2 (diluição nativo 1:2, diluição dopado 1:2, diluição controlo 1:2), para se testar a recuperação de padrão adicionado neste tipo de amostras e a linearidade das mesmas. Para tal construiu-se a curva de calibração, com o modelo sigmoidal de *Boltzmann*, por ser o tipo de função recomendada para os dados obtidos (figura 9). O modelo apresenta-se pela equação seguinte:

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + e^{(x-x0)/dx}} + A2$$

em que A1 corresponde à assíntota inferior, A2 a assíntota superior, x_0 ao valor da inflexão da curva e dx à taxa de crescimento da curva.

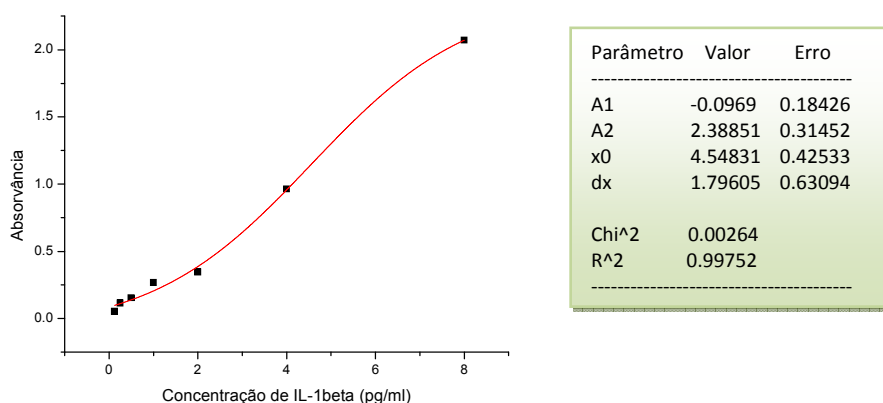


Figura 9 – Curva de calibração do ensaio de validação da matriz de EBC, e respectivos parâmetros de curva.

A curva de calibração obtida em que o mínimo corresponde a uma concentração de 0,125 pg/ml e o máximo a 8 pg/ml, apresenta absorvâncias de, respectivamente, 0,053 e 2,071. As absorvâncias obtidas por espectrofotometria para as amostras de EBC em análise encontram-se na tabela 9, e todas as amostras têm absorvâncias inferiores ao mínimo da curva de calibração pelo que através desta função é impossível determinar as suas concentrações. No sentido de simplificar a determinação das concentrações utilizou-se uma função de ajuste linear, como está representado na figura 10. Foi retirado o valor padrão de 2 pg/ml para melhor otimizar a função de regressão.

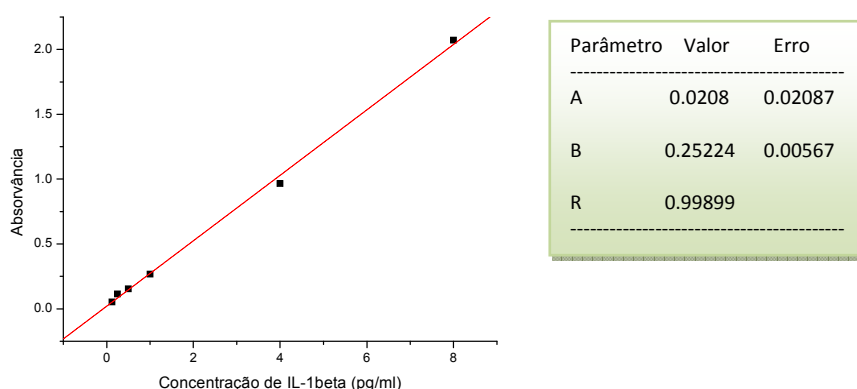


Figura 10 – Curva de calibração linearizada a partir da curva do gráfico da figura 9, e respectivos parâmetros.

O facto de a curva de calibração deste kit ser uma sigmoide de *Boltzmann* dificulta muito a tarefa de determinação rigorosa dos níveis desta citocina, uma vez que esta determinação é feita por interpolação dos valores obtidos na função, uma vez que é muito difícil fazer a função inversa da função de *Boltzmann*. Esta posterior linearização da recta, embora nos permita

determinar as concentrações a partir das absorvâncias obtidas, que se encontram mesmo no limite mínimo da curva de calibração, retira grande rigorosidade à determinação. A absorvância final corresponde ao valor médio corrigido com a absorvância do branco, tendo sido usado o valor mais pequeno de absorvância do branco (0,109) e não a média dos dois valores (0,148), uma vez que é um valor de absorvância superior a qualquer uma das absorvâncias das amostras representadas.

Tabela 9 – Absorvâncias e concentrações de IL-1 β para as amostras de EBC usadas na validação da matriz.

amostra	Absorvâncias			Dif. (%)	médias	Absorvância final	Concentração IL-1 β (pg/ml)
	490 nm	650 nm	490-650				
EBC nativo	0,2365	0,123	0,1135	4,5	0,13615	0,02675	0,0236
	0,2695	0,1107	0,1588				
EBC dopada	0,273	0,1223	0,1507	2,6	0,13765	0,02825	0,0296
	0,2436	0,119	0,1246				
controlo	0,2594	0,1153	0,1441	1,8	0,1353	0,0259	0,0203
	0,2394	0,1129	0,1265				
diluição nativa 1:2	0,2865	0,1216	0,1649	3,8	0,1457	0,0363	0,0615
	0,2634	0,1369	0,1265				
diluição dopada 1:2	0,2718	0,1069	0,1649	5,2	0,13895	0,02955	0,0347
	0,2223	0,1093	0,113				
diluição controlo 1:2	0,2569	0,1293	0,1276	0,9	0,12295	0,01355	*
	0,2425	0,1242	0,1183				

Dif. (%) – diferença percentual entre duplicados
 * Valor abaixo do limite mínimo de detecção.

As concentrações obtidas encontram-se muito próximas do mínimo detectado por este kit (0,023). Pela curva linearizada, consegue-se obter até um valor abaixo deste limite de detecção para a amostra controlo, e no caso da sua diluição o valor obtido foi negativo.

Como se pode ainda constatar os valores de concentração obtidos nas amostras diluídas foram superiores aos das amostras não diluídas, o que reflecte a grande incerteza na determinação da concentração de IL-1 β nesta gama de absorvâncias. De igual forma, as amostras dopadas não apresentaram valores de absorvância e de concentração superiores às amostras nativas. Como foram adicionados 0,016 pg de IL-1 β à amostra de EBC nativa, dever-se-ia obter uma concentração igual ou superior a 0,0396 pg/ml (EBC nativo + 0,016pg), o que não se pode verificar. Desta forma, estando perante valores muito perto e até abaixo do limite de detecção, não se pôde calcular a recuperação.

Perante estes resultados, delineou-se um 2º ensaio, em que se aumentou a concentração de amostra padrão adicionada às amostras de EBC, de forma a obter concentrações finais de IL-1 β

numa zona mais central da curva de calibração. Para além disso, procedeu-se também à liofilização para pré-concentrar as amostras por um factor de dois, como referido anteriormente. Foram testadas amostras de EBC de dois indivíduos (EBC 1 e 2) as quais foram analisadas directamente e dopadas com IL-1 β .

Foi estabelecida uma curva de calibração no dia do ensaio, tendo-se efectuado o ajuste com a função de *Boltzmann* descrita anteriormente. Obtiveram-se como limite mínimo a concentração de 0,125 pg/ml e como limite máximo a concentração de 8 pg/ml, as quais corresponderam a absorvâncias de 0,043 e 1,117. O valor de absorvância para a concentração de 0,25 pg/ml foi muito elevado, provavelmente por algum erro de pipetagem cometido durante o procedimento, pelo que foi retirado do ajuste (figura 11).

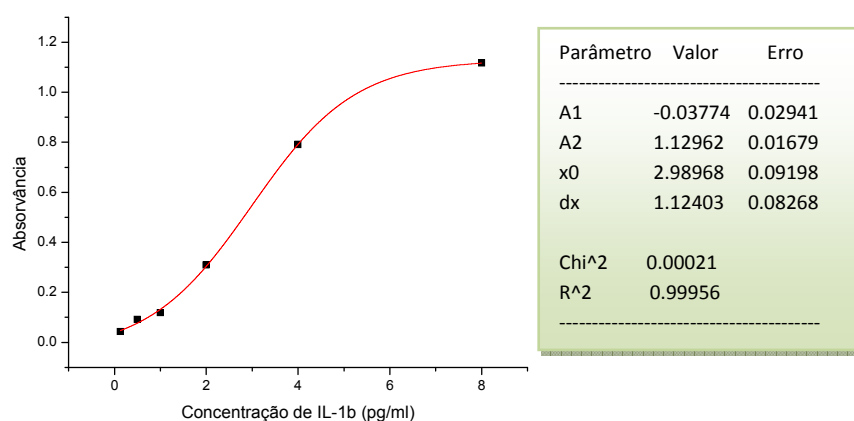


Figura 11 – Curva de calibração obtida no 2º ensaio para determinação das concentrações de IL-1 β nas amostras de EBC, e respectivos parâmetros

As amostras de EBC utilizadas neste ensaio foram:

- a) Nativas;
- b) EBC pré-concentrado 2x – amostras reconstituídas em água para um volume final 2x inferior ao volume original;
- c) Amostras EBC nativas e pré-concentradas dopadas com IL-1 β numa concentração final de 3.2 pg/ml.

Foram testadas duas amostras de EBC distintas 1 e 2. Foram ainda utilizadas amostras controlo (padrão de IL-1 β) e três amostras de soro humano (soro 1 a 3).

As absorvâncias obtidas para as amostras de EBC e respectivas concentrações estão indicadas na tabela 10. A absorvância final corresponde à média das absorvâncias dos duplicados a que se

subtraiu a absorvância do branco de 0,249, mais uma vez o valor mais baixo obtido em vez da média dos duplicados.

Tabela 10 – Absorvâncias e concentrações de IL-1 β obtidas nas amostras de EBC e soro usadas no 2º ensaio.

amostra	Absorvâncias			Dif. (%)	médias	Absorvância final	[IL-1 β] (pg/ml)	Recuper. (%)
	490 nm	650 nm	490-650					
EBC 1 nativo	0,3503	0,1251	0,2252	1,2	0,2313	*	-	-
	0,3822	0,1448	0,2374					
EBC 1 pré-concentrado 2x	0,4382	0,1236	0,3146	6,9	0,2800	0,03125	**	-
	0,3738	0,1283	0,2455					
EBC 2 nativo	0,3613	0,1328	0,2285	36,3	0,4100	0,16125	1,21105	-
	0,7322	0,1406	0,5916					
EBC 2 pré-concentrado 2x	0,3593	0,1139	0,2454	0,1	0,2456	*	-	-
	0,3593	0,1134	0,2459					
EBC 1 nativo + 3.2 pg/ml IL-1 β	0,8898	0,1368	0,753	5,0	0,7278	0,47905	2,73094	85,34
	0,8577	0,155	0,7027					
EBC 1 nativo + 2,9 pg/ml IL-1 β	0,7481	0,1305	0,6176	16,7	0,7011	0,4523	2,62589	82,06
	0,9492	0,1646	0,7846					
EBC 1 pré-concentrado 2x + 3.2 pg/ml IL-1 β	0,8691	0,1442	0,7249	9,3	0,6782	0,4294	2,53477	79,21
	0,7645	0,133	0,6315					
EBC 2 nativo + 3.2 pg/ml IL-1 β	0,721	0,1381	0,5829	16,1	0,6632	0,41445	2,47437	77,32
	0,884	0,1404	0,7436					
EBC 2 nativo + 3.2 pg/ml IL-1 β	0,751	0,1321	0,6189	21,6	0,5109	0,26215	1,79578	56,12
	0,523	0,12	0,403					
EBC 2 pré-concentrado 2x + 3.2 pg/ml IL-1 β	0,8917	0,1428	0,7489	12,1	0,6885	0,43975	2,57604	80,50
	0,7767	0,1485	0,6282					
controle	0,799	0,1369	0,6621	6,3	0,693700	0,4449	2,59659	81,14
	0,8696	0,1443	0,7253					
soro 1	0,4209	0,1432	0,2777	2,2	0,266650	0,01785	**	-
	0,3872	0,1316	0,2556					
soro 2	1,0025	0,1451	0,8574	9,1	0,903050	0,65425	3,41166	-
	1,0965	0,1478	0,9487					
soro 3	0,4337	0,118	0,3157	5,5	0,288150	0,03935	**	-
	0,3887	0,1281	0,2606					

Dif. (%) – diferença percentual entre duplicados

* Absorvância final dá valor negativo após correcção com o branco;

** Valores abaixo do valor mínimo da curva de calibração;

Observando os valores obtidos pode-se fazer a seguinte distinção:

- **amostras nativas vs. amostras pré-concentradas**

Neste ensaio as amostras liofilizadas foram reconstituídas para um volume duas vezes menor relativamente ao volume inicial. As amostras *EBC 1 nativo* e *EBC 2 pré-concentrado 2x* dão valores de concentração negativos após subtração do branco, e a amostra *EBC 1 pré-concentrado 2x* apresenta uma absorvância final inferior ao mínimo da curva de calibração. Das amostras nativas, apenas para a *EBC 2 nativo* se consegue determinar a concentração de IL-1 β . É de realçar que as absorvâncias obtidas nos replicados desta amostra foram muito díspares (diferença entre replicados de 36%), o que reflecte a grande incerteza na determinação de baixos valores de IL-1 β . Esperava-se obter valores de concentrações positivos nas amostras *EBC 1 e 2 pré-concentradas 2x*, o que não foi verificado. À semelhança das amostras nativas, as concentrações de IL-1 β situaram-se abaixo do limite de detecção.

Por conseguinte, a determinação de IL-1 β nas amostras pré-concentradas 2x não foi conclusiva.

- **amostras dopadas**

À semelhança do ensaio 1, não se observaram diferenças no valor de concentração de IL-1 β obtido nas amostras nativas dopadas e amostras pré-concentradas dopadas. Em nenhuma das amostras se obteve concentrações superiores ou iguais à quantidade adicionada. Os valores de concentração das amostras pré-concentradas dopadas não são consistentemente superiores aos das amostras dopadas sem pré-concentração. Uma das amostras pré-concentradas apresenta valores inferiores aos obtidos na alíquota da mesma amostra sem pré-concentração.

Verificou-se uma taxa de recuperação baixa, inferior a 86%. Não se observaram diferenças entre as taxas de recuperação nas amostras nativas, reconstituídas em água (EBC pré-concentrado) nem nas amostras controlo (padrão de IL-1 β em diluente de calibração). A amostra controlo, à qual também foi adicionada 3,2 pg/ml de IL-1 β adicionada em diluente de calibração, tem uma taxa de recuperação de 81,14%.

Consequentemente, a baixa taxa de recuperação obtida foi independente da matriz.

Relativamente às três amostras de soros utilizados (2 indivíduos saudáveis e 1 doente), apenas num deles se conseguiu quantificar IL-1 β (indivíduo saudável). O valor de concentração obtido neste trabalho foi muito superior ao indicado pelo fabricante para indivíduos saudáveis (0,201 pg/ml). No entanto não são conhecidos os valores normais de IL-1 β para a população Portuguesa. O valor elevado obtido poderá resultar de incertezas associadas à determinação de

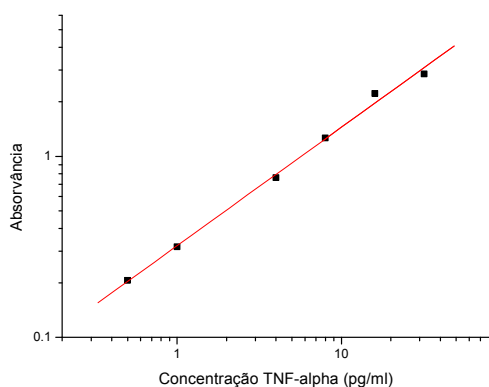
IL-1 β com o kit utilizado ou de incertezas resultantes de um longo período de armazenamento (superior a 6 meses, -80 °C) que poderá causar degradação de constituintes da amostra.

É importante salientar as dificuldades tidas na execução deste kit. Os reagentes do kit, como por exemplo, as soluções de diluição e o padrão reconstituído não eram fáceis de manipular por pipetagem devido à viscosidade. A pipetagem de alguns reagentes nos poços gerava bolhas/espuma. Além disso, o branco (que corresponde ao diluente de calibração) possuía uma coloração muito acentuada, e como se verificou as absorvâncias dos brancos tinham valores demasiado altos, semelhantes ao valor mais baixo da curva de calibração, para o que usualmente se obtém num teste ELISA.

4.6.2 Determinação da concentração de TNF- α

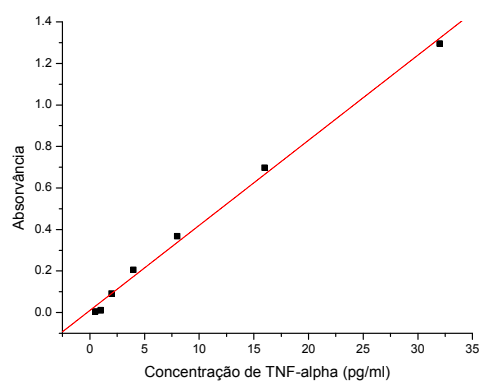
Para a determinação da concentração desta citocina, as amostras foram analisadas em dois ensaios, pelo que realizou-se uma curva de calibração para cada ensaio (figura 12a e 12b), com um mínimo e um máximo de concentração de TNF- α de, respectivamente, 0,5 pg/ml e 16 pg/ml. Ao contrário da curva de calibração para o IL-1 β , a curva usada para esta citocina é linear, o que apresenta vantagens em relação à precisão e facilidade da obtenção das concentrações para as nossas amostras.

a)



Parâmetro	Valor	Erro
A	-0.49347	0,0197
B	0.65377	0,02162
R	0.99782	

b)



Parâmetro	Valor	Erro
A	0.00961	0.01706
B	0.041	0.00122
R	0.99779	

Figura 12 – Curvas de calibração a) e b) usadas no ensaio 1 e 2, e respectivos parâmetros de curva.

Foi retirado o valor de 2 pg/ml para se traçar a curva de calibração 12a, pois apresentava um valor muito elevado resultante de erro durante o pipetagem. Na curva 12a, o mínimo e o máximo tiveram absorvâncias de 0,206 e 2,848, respectivamente. Para a curva 12b estas foram de 0,004 e 1,296. Os valores de branco obtidos são de 0,268 e 0,141. Ambas as curvas apresentam bons valores de regressão. Os resultados para as amostras de EBC, em ambos os ensaios, encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Absorvâncias e concentrações de TNF- α das amostras de EBC e soro analisadas.

		Absorvâncias								
	amostra	490 nm	650 nm	490-650	Dif. (%)	médias	Absorvância final	[TNF-alpha] (pg/ml)	Recuper. (%)	
ensaio 1	soro 4	0,6652	0,1103	0,5550	1,2	0,5492	0,2810	0,9499	-	
		0,6675	0,1240	0,5434						
	soro 5	1,3057	0,1465	1,1592	66,3	0,8277	0,5595	2,6689	-	
		0,6373	0,1411	0,4962						
	EBC 1 nativo	0,3618	0,1109	0,2509	3,5	0,2684	0,0002	**	-	
		0,4002	0,1143	0,2859						
	EBC pré-concentrado 4x PBS	0,3622	0,1100	0,2520	5,9	0,2813	0,0131	**	-	
0,4266		0,1159	0,3106							
ensaio 2	EBC 2 nativo	0,2610	0,1067	0,1543	1,4	0,1615	0,0204	0,2628	-	
		0,2898	0,1211	0,1687						
	EBC liofilizado DC	0,2297	0,1126	0,1171	0,4	0,1190	*	-	-	
		0,2418	0,1210	0,1208						
	EBC pré-concentrado 10x PBS	0,2263	0,1078	0,1185	0,1	0,1189	*	-	-	
		0,2362	0,1169	0,1193						
	EBC pré-concentrado 10x DC	0,2277	0,1122	0,1154	3,6	0,1334	*	-	-	
		0,2713	0,1199	0,1514						
	EBC pré-concentrado 10x PBS + 4pg/ml TNF- α	0,4213	0,1140	0,3073	1,1	0,3126	0,1714	3,9469	98,7	
		0,4396	0,1216	0,3180						
	EBC pré-concentrado 10x DC + 3,2 pg/ml TNF- α	0,3722	0,1103	0,2619	0,3	0,2633	0,1221	2,7449	85,8	
0,3959		0,1312	0,2648							

Dif. (%) – diferença percentual entre duplicados

* Absorvância final dá valor negativo após correção com o branco; ** Valores abaixo do valor mínimo da curva de calibração;

Para os soros analisados no 1º ensaio, observa-se uma grande discrepância entre duplicados do soro 5, que poderá ser devida a um erro durante o procedimento. Contudo, os valores de concentração obtidos estão consoante o esperado, uma vez que o soro 5, indivíduo com doença coronária, deveria ter maior concentração de TNF- α do que o indivíduo saudável soro 4. Os valores encontram-se perto dos valores obtidos anteriormente num outro estudo para estes mesmos soros (0.04 pg/ml de TNF- α para o soro 4 e 3.87 pg/ml para o soro 5). Para além disso, os valores obtidos para estes soros estão dentro dos valores médios da análise de um conjunto de soros de indivíduos saudáveis e doentes, no qual estas duas amostras estão inseridas, com grupo de voluntários saudáveis (0.58 ± 0.52 pg/ml) e o grupo de doentes com enfarte do miocárdio (2.2 ± 1.5 pg/ml).

- **amostras *nativas* vs. amostras *pré-concentradas***

Não se detectou TNF- α acima do limite de detecção nas amostra de *EBC nativo 1*, *EBC liofilizado DC*, nem nas amostras *EBC pré-concentrado 4x* ressuspensas em PBS, *EBC pré-concentrado 10x* ressuspensado em PBS e *EBC pré-concentrado 10x* em diluente de calibração. As absorvâncias obtidas para estas amostras nos 2 ensaios após subtração do branco correspondiam a valores negativos na curva de calibração. Verifica-se que as amostras pré-concentradas possuíam uma absorvância superior à não pré-concentrada, contudo estes valores foram muito inferiores ao intervalo de concentrações detectáveis indicado pelo fabricante.

Apenas uma das amostras *nativas de EBC* (sem pré-concentração) analisadas apresenta uma concentração de TNF- α de 0,26 pg/ml.

Nestes ensaios foram usados PBS e diluente de calibração para reconstituir a amostra de EBC liofilizada em vez de água destilada (como no 2º ensaio de IL-1 β para as amostras liofilizadas). A reconstituição do EBC num meio salino como o PBS poderá garantir a estabilidade de proteínas e simular a matriz do EBC. A reconstituição no diluente de calibração garante à partida um meio óptimo para as reacções imunoenzimáticas do método ELISA. Contudo, o PBS contém iões fosfato que poderão interferir na detecção de TNF- α (o fosfato inorgânico é um inibidor da fosfatase alcalina).

Nestes ensaios para o TNF- α a liofilização não conduziu a valores positivos de TNF- α , não sendo também conclusiva a interferência do PBS na detecção de TNF- α ou eventuais vantagens no uso do diluente de calibração.

- **amostras *pré-concentradas dopadas***

Em relação às amostras dopadas (que sofreram pré-concentração de 10 vezes) existem boas taxas de recuperação, com valores superiores às obtidas para os ensaios de IL-1 β , no qual as amostras liofilizadas foram ressuspensas em água. A amostra reconstituída em PBS e dopada apresenta uma taxa de recuperação superior ao da amostra ressuspensa em diluente de calibração. Isto pode significar que o efeito da interferência do fosfato inorgânico do PBS é muito pequeno na medição do TNF- α e o PBS pelas suas propriedades isotónicas que impedem a desnaturação e alterações conformacionais das proteínas pode ter gerado um bom meio para a detecção do TNF- α . Contudo, apesar das boas taxas de recuperação e, tendo em conta que as amostras foram liofilizadas 10 vezes dever-se-ia obter valores superiores às quantidades adicionadas, o que não se verificou. Este kit não apresentou as mesmas dificuldades do kit de IL-1 β .

4.6.3 Sumários dos resultados

Os resultados obtidos para a determinação da concentração das duas citocinas em amostras de EBC podem ser resumidos nos seguintes pontos:

- × as concentrações normais das citocinas IL-1 β e TNF- α são muito baixas nas amostras de EBC, encontrando-se perto e abaixo de limite de detecção das curvas de calibração utilizadas;
- × a pré-concentração por reconstituição de amostra liofilizada em 2, 4 e 10 vezes um volume inferior ao da amostra original parece falhar para este tipo de matriz, uma vez que não se observa aumento significativo das concentrações de citocina, não se conseguindo em nenhuma destas pré-concentrações a detecção das citocinas nas amostras utilizadas;
- × as concentrações obtidas para as amostras dopadas *não* espelham a pré-concentração por adição de padrão;
- × nas amostras dopadas obteve-se uma baixa taxa de recuperação para a IL-1 β inferior a 85%, e uma boa taxa de recuperação para TNF- α próxima de 100% independentemente da solução de reconstituição utilizada;
- × consequentemente a matriz não influenciou a detecção destas citocinas uma vez que:
 - amostra controlo de IL-1 β (padrão) apresenta uma taxa de recuperação similar à das amostras de EBC liofilizadas e reconstituídas em água destilada;

- usando o diluente de calibração do kit como meio de reconstituição das amostras de EBC liofilizadas, que deveria garantir um meio óptimo das reacções imunoenzimática para a detecção de IL-1 β não se melhorou a detecção nem a taxa de recuperação;
 - quando se utilizou PBS para reconstituir as amostras liofilizadas, não se verificou diminuição da concentração de TNF- α esperada, tendo-se observado uma excelente taxa de recuperação nas amostras dopadas (*EBC pré-concentrado 10x PBS dopado*)
- × os soros usados nos quais se obtiveram resultados positivos indicam que os ensaios foram realizados correctamente, já que os valores de concentração obtidos para o TNF- α reproduzem os determinados noutro estudo para as mesmas amostras, mesmo após um período longo de armazenamento que poderia ter induzido degradação de componentes da amostra, em particular das citocinas.

4.7 Análise comparativa dos dados

Foi estudado se as variáveis obedeciam a uma distribuição normal. Foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* variáveis contínuas: idade, anos de trabalho, níveis de chumbo no sangue, NO, FVC(%), FEV1(%), FEV1/FVC(%), FEF50(%), IMC e volume médio de EBC recolhido por unidade de tempo. As variáveis que apresentaram normalidade são: idade, níveis de chumbo no sangue, IMC, FEV1(%), FEV1/FVC(%), FEF50(%) e volume médio de EBC recolhido (tabela do Anexo 3).

Para ter uma perspectiva geral da interacção entre as variáveis, fez-se a correlação com os dados dos três grupos. As correlações com as três variáveis, para os indivíduos dos três grupos estão apresentadas na tabela 12. Existem diversos valores de *n* uma vez que nem todos os indivíduos possuem a informação completa para todas as variáveis, pelo que se apresenta a amostragem para cada correlação bivariada.

Tabela 12 – Coeficientes de correlação de Spearman (salvo exceções referenciadas) entre as variáveis em estudo.

Parâmetro	NO	<i>n</i>	Pb no sangue	<i>n</i>	vol. médio de EBC recolhido	<i>n</i>
sexo	-0,268*	61	-0,407*	34	-0,314*	76
idade	0,014	61	-0,063 ^a	34	-0,228** ^a	76
antiguidade	0,021	42	0,113	34	-0,039	51
hábitos tabágicos	-0,360**	61	-0,027	34	0,076	76
alergias	0,488**	61	-0,027	34	-0,016	70
NO	-	-	-0,162	24	0,129	58
Pb no sangue	-	-	-	-	-0,423** ^a	32

* correlação significativa para $p < 0,05$

** correlação significativa para $p < 0,01$

^a coeficiente de Pearson, pois tratam-se de duas variáveis com distribuição normal

Os níveis de chumbo no sangue correlacionam-se significativamente com o sexo ($r=-0,407$, $p<0,05$) em que o sexo feminino apresenta menores valores de chumbo no sangue. Esta distribuição poderá estar influenciada pelo grupo A ser constituído totalmente por indivíduos do sexo masculino e pelos valores de chumbo no sangue destes trabalhadores serem muito superiores aos dos indivíduos da fábrica B.

O volume médio de EBC recolhido (durante 15 min), também se correlacionou com o sexo ($r=-0,314$, $p<0,05$) e com a idade ($r=-0,228$, $p<0,05$). As mulheres produzem menores volumes de EBC e o volume de EBC obtido diminuiu com o aumento da idade do indivíduo. Verificou-se ainda uma correlação significativa entre esta variável e os níveis de chumbo no sangue ($r=-0,423$, $p<0,05$). Para os indivíduos com maiores níveis de chumbo no sangue obtiveram-se volumes de EBC menores.

Relativamente ao NO, verificou-se uma correlação entre o sexo, em que os indivíduos do sexo feminino apresentam valores mais baixos de NO ($r=-0,268$, $p<0,05$). O NO correlacionou-se significativamente com os hábitos tabágicos ($r=-0,360$, $p<0,01$) e com sintomas ou doenças alérgicas ($r=0,488$, $p<0,01$). Os fumadores possuem menores níveis de NO (figura 13), e inversamente queixas alérgicas associaram-se ao aumento de NO.

A correlação entre NO e os níveis de chumbo no sangue não foi significante.

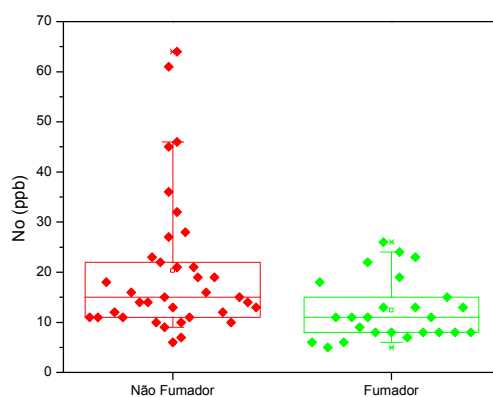


Figura 13 – Comparação para os níveis de NO exalado (em ppb) entre fumadores e não-fumadores, para os dados totais.

Fábrica A

Avaliando apenas o grupo A, estudou-se a relação das variáveis acima referidas com a função respiratória. Na tabela 13 apresentam-se apenas as correlações significativas obtidas.

Tabela 13 – Coeficientes de correlação de Pearson que apresentam significância para as variáveis em estudo, para o grupo A.

Parâmetro	NO	n	Pb no sangue	n	vol. médio de EBC recolhido	n
FEV1(%)	n.s.	14	0,760**	11	n.s.	11
FVC (%)	n.s.	14	0,674*	11	n.s.	11
Pb no sangue	n.s.	11	-	-	-0,645*	14

* correlação significativa para $p < 0,05$
 ** correlação significativa para $p < 0,01$
 n.s. – sem significância

A correlação verificada para os 3 grupos entre o NO e os hábitos tabágicos e o histórico alérgico não foi verificada no grupo A. No entanto, a correlação observada nos 3 grupos entre os níveis de chumbo no sangue e o volume médio de EBC recolhido, foi também observada no grupo A ($r = -0,645$, $p < 0,05$).

A concentração de chumbo no sangue correlacionou-se significativamente com a função respiratória. Como se pode observar na tabela 13, o chumbo no sangue relacionou-se com os parâmetros de espirometria, FEV1(%) ($r = 0,760$, $p < 0,01$) e FVC(%) ($r = 0,674$, $p < 0,05$) em que os valores para estas variáveis aumentam em indivíduos com maiores níveis de chumbo no sangue.

No grupo A, tal como verificado na análise compreendendo os 3 grupos, também não se observaram correlações significativas entre os valores de NO e os de chumbo no sangue.

Não foram também observadas associações entre a duração da exposição (antiguidade) e as restantes variáveis.

Fábrica B

Para o grupo de trabalhadores da fábrica B (grupo B), as variáveis para as quais se obtiveram correlações significativas estão representadas na tabela 14.

Tabela 14 – Coeficientes de correlação de Spearman que apresentam significância para as variáveis em estudo, para o grupo B.

Parâmetro	NO	n	Pb no sangue	n	média de EBC recolhido	n
sexo	n.s.	28	n.s.	18	-0,582**	36
tabaco	-0,418*	28	n.s.	18	n.s.	36
alergias	0,517**	28	n.s.	18	n.s.	36

* correlação significativa para $p < 0,05$
 ** correlação significativa para $p < 0,01$
 n.s. – sem significância

Neste grupo, verificou-se também uma correlação significativa entre o volume médio de EBC recolhido e o sexo ($r = -0,582$, $p < 0,01$), em que volumes inferiores de EBC se associam ao sexo feminino.

A concentração de NO no ar exalado encontra-se correlacionada com os hábitos tabágicos ($r = -0,418$, $p < 0,05$) e o histórico alérgico ($r = 0,517$, $p < 0,01$), como se verificou na avaliação conjunta dos três grupo (ver tabela 12).

Também para o grupo B, à semelhança do anteriormente apresentado, não se obtiveram associações significativas entre as concentrações de NO, de chumbo no sangue e os anos de exposição.

Grupo controlo

No grupo controlo não se observaram correlações significativas para o NO, sexo idade, hábitos tabágicos, queixas alérgicas e volume de EBC recolhido.

5. DISCUSSÃO

O objectivo principal deste trabalho consistiu em relacionar a resposta das vias respiratórias à exposição a metais em ambiente laboral. Para avaliar o efeito dos poluentes inalados estudou-se a concentração de NO exalado e de citocinas no EBC.

Para a determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , nas amostras de EBC utilizou-se o método de ELISA. Apesar do número de publicações referindo a medição de citocinas no EBC por ELISA, e sendo uma área de investigação actual, pouco tem sido o esforço feito na validação destes métodos para esta matriz. Neste trabalho desenvolveram-se protocolos para avaliar o efeito da matriz de EBC na determinação de citocinas, com vista à validação do procedimento analítico. Contudo, a determinação de IL-1 β e TNF- α não foi possível mesmo em amostras de EBC pré-concentradas, situando-se os resultados sempre abaixo do limite de detecção da curva de calibração. A reconstituição de amostras liofilizadas de EBC em diferentes meios como água, tampão isotónico (PBS) e soluções de diluição fornecidas pelo fabricante do kit (diluyente de calibração) também não conduziram a resultados positivos quer para IL-1 β , quer para TNF- α . No entanto para as amostras de EBC dopadas com concentrações conhecidas de IL-1 β e TNF- α , quer para amostras nativas ou reconstituídas obtiveram-se sempre taxas de recuperação aceitáveis principalmente para TNF- α , provavelmente relacionado com uma maior facilidade na execução do kit e com a utilização de uma curva de calibração linear. É possível que os kits comerciais de ELISA, usados para as amostras de soro, plasma e cultura de células não sejam totalmente adequados para o EBC. Contudo, alguns factores poderão ter interferido nos resultados.

- **temperatura e tempo de congelação.** Algumas amostras de IL-1 β foram congeladas a -20°C e não a -80°C como as restantes. Contudo, se a temperatura de congelação a que foram sujeitas as amostras de IL-1 β interferisse, seria esperado valores positivos para as restantes, nomeadamente, para o TNF- α , o que não se verificou. Relativamente ao tempo de armazenamento, este foi sempre muito curto para que houvesse deterioração dos componentes do EBC, porém não há estudos previamente publicados sobre a alteração da estabilidade ou perda de proteína com o tempo de armazenamento para EBC ^[15]. Relativamente à congelação não ser realizada logo após a colheita pode levar à instabilidade das moléculas. Entre a recolha e o armazenamento houve variações de temperatura. O EBC é recolhido numa câmara em que a temperatura nas paredes é de aproximadamente -15°C. Durante o manuseamento e separação do EBC em diferentes alíquotas, estas encontram-se à temperatura ambiente, e é depois transportado em ambiente refrigerado até ao laboratório onde é armazenado em ultracongeladora. Este ciclo de diferença de temperatura é apontado como uma causa para a alteração da estabilidade das

moléculas ^[15], contudo não existem dados concretos que façam a comparação entre os dois cenários, congelação imediata e congelação após manuseamento.

- **equipamento de recolha do EBC.** A aderência dos biomarcadores a vários tipos de superfícies de condensação devido às suas propriedades adesivas e às alterações de temperatura durante a condensação têm sido consideradas como responsáveis na variação de resultados. No EcoScreen, o ar exalado condensa numa superfície de teflon e a amostra de condensado é colhida num tubo de polipropileno ^[44]. Um artigo recente de Rosias *et al* mostrou que revestimentos interiores de vidro e silicone são mais eficazes ao sistema de alumínio, propileno e teflon do EcoScreen na medição dos níveis de 8-isoprostano e albumina no EBC, referindo ainda que a albumina possui peso molecular (66.000 Dalton) muito semelhante aos das citocinas (<80.000 Dalton) ^[45]. Outro artigo de Liu *et al.* mostra que apesar do EcoScreen se ter apresentado, comparativamente com outros três tipos de colectores, o mais consistente e mais eficiente para a recolha de proteína e para volume total de EBC, os colectores de vidro e de silicone apresentaram melhor reprodutibilidade comparada com o EcoScreen e pelo Rtube, que pode ser explicado pelo facto de o biomarcador em estudo no artigo, a mucina, ter carga negativa assim como o vidro e existir o efeito de repulsa de cargas. Eles concluem que não existe um condensador ideal para todas as aplicações/testes, e que em cada estudo devem ser testados vários tipos de colectores para cada biomarcador de forma a encontrar o aparelho que possui uma recolha mais eficiente dessa mesma molécula ^[46]. Adicionalmente, Tufvesson *et al.* mostrou que revestir todas as superfícies do aparelho de recolha que se encontram em contacto com a amostra do EBC, com albumina de soro de bovino diminui a aderência das moléculas inflamatórias, principalmente de proteínas, a estas superfícies plásticas ^[42].

- **liofilização.** A liofilização é a técnica de excelência para preservação de moléculas e vastamente utilizada em processos que requerem pré-concentração ^[19]. Os padrões de IL-1 β e TNF- α são também fornecidos liofilizados. No entanto, substâncias voláteis, semi-voláteis e instáveis podem sofrer perdas durante a liofilização ^[15]. No caso da determinação de IL-1 β e TNF- α no EBC, a liofilização não conduziu a resultados conclusivos.

- **instabilidade da citocina.** As citocinas no EBC, podem não estar estabilizadas e também não se sabe se existe alteração das suas propriedades químicas durante a passagem dos fluidos de revestimento do epitélio pulmonar para o ar exalado, ou durante a condensação ou até no período de armazenamento. Estas alterações podem levar estas moléculas a terem uma baixa afinidade ou fraca reactividade, limitando a eficácia dos métodos imunoenzimáticos. Alguns trabalhos recentes, como o de Sack *et al* verificaram um melhor desempenho de citometria na determinação de citocinas no EBC comparativamente ao método ELISA ^[47].

Tal como na recolha do EBC, o que pode funcionar para um biomarcador pode não acontecer para outro. Cada biomarcador tem de ser considerado individualmente pela sua diferente solubilidade, estabilidade, volatilidade e quantidade.

De forma a validar a medição para cada marcador inflamatório, os métodos de recolha e de análise mais apropriados deverão ser estudados. Também a estabilidade da molécula em causa poderá ser um factor determinante para a qualidade dos resultados. Em muitos dos trabalhos publicados a metodologia de recolha e análise não se encontram claramente descritas e os valores médios dos biomarcadores registados em EBC estão normalmente situados numa zona de baixas concentrações. Este facto pode ser devido aos níveis de biomarcadores inflamatórios nos fluidos do epitélio de revestimento pulmonar serem intrinsecamente baixos ou de apenas pequenas quantidades destas moléculas serem libertadas desta zona para o ar exalado ^[45].

Relativamente ao outro biomarcador estudado, as variações de NO no ar exalado não foram significativamente diferentes entre os grupos de trabalhadores expostos a metais e o grupo controlo ($p < 0,355$). No entanto, verificou-se que o NO se correlaciona significativamente com o sexo, hábitos tabágicos e alergias. Vários estudos também encontraram maiores concentrações de NO no ar exalado no sexo masculino ^[48,49]. Esta diferença poderá resultar do maior calibre das vias respiratórias, em geral, no sexo masculino. Em relação aos hábitos tabágicos, observamos níveis inferiores de NO em fumadores. Por exemplo, Kharitonov *et al* mostrou que os níveis de FeNO são cerca de 50% mais baixos nos fumadores comparados com os não-fumadores ^[50], e outros artigos registaram resultados semelhantes ^[51,52,53]. A causa da diminuição dos níveis de NO exalado associado com hábito tabágico deve-se ao facto de o fumo do tabaco diminuir a actividade do iNOS nas células do epitélio pulmonar ^[54] e do eNOS nas células endoteliais das artérias pulmonares ^[55].

Vários artigos referem também o aumento dos níveis de NO com a idade ^[56], o que não foi encontrado neste trabalho, provavelmente porque a faixa etária dos indivíduos incluídos nos 3 grupos ser relativamente próxima (24-63 anos), ao contrário do que se passa no estudo referido em que se faz a comparação entre dois grupos: grupo jovem com idade mediana de 24 anos e grupo idoso com uma idade mediana de 72 anos.

Por motivos de agendamento do trabalho do projecto a avaliação clínica só foi efectuada na fábrica A. Para este grupo de trabalhadores não se observam alterações na função respiratória. Os níveis de NO registados não se relacionaram com os parâmetros de espirometria (FEV1, FVC, FEV1/FVC e FEF₅₀) nem com indicadores biométricos, embora Winter-de Groot *et al* tenha registado correlação significativa entre o NO e o IMC ^[57]. Provavelmente esta correlação não se verifica provavelmente devido à homogeneidade do grupo. No entanto, na ausência de correlação entre o NO e a função respiratória tem sido descrito por diversos autores ^[58,59].

Os três grupos não apresentaram diferença significativa de volume médio de EBC recolhido. Porém, verificou-se que o volume de EBC recolhido é maior nos homens. Esta relação poderá estar influenciada pelo maior número de homens relativamente ao das mulheres nos grupos estudados. E verificaram-se também correlações significativas inversas entre o volume de EBC com a idade e os níveis de chumbo no sangue. A diminuição de volume de EBC obtido com a idade pode ser justificada por uma melhor condição física dos indivíduos mais jovens. Não se encontra esta relação significativa em estudos publicados, apenas somente para grupos etários juvenis ^[60,61]. O volume de EBC recolhido encontra-se relacionado com os níveis de chumbo no sangue, o que sugere alterações discretas nas vias respiratórias expostas a chumbo, mesmo em indivíduos com funções pulmonares normais.

O valor médio dos níveis de chumbo no sangue da fábrica A é o dobro do valor médio para a fábrica B, o que espelha as más condições do ambiente de trabalho e de medidas de protecção ao nível da exposição individual ao chumbo. Para os níveis de chumbo no sangue, fornecidos pelas fábricas, não se verificou nenhuma relação entre os seus valores e a antiguidade. Verificou-se, porém, uma correlação significativa positiva entre os parâmetros de espirometria com os níveis de chumbo no sangue para a grupo A, o que não se esperaria uma vez que o chumbo poderia induzir um défice de função pulmonar. Stoleski *et al* verificaram uma correlação inversa entre o FEV₁ e os níveis de chumbo no sangue ^[62]. Neste trabalho só foi possível recolher informação para 11 indivíduos e na sua maioria foram trabalhadores a finalizar o turno de trabalho. A aceleração do ritmo respiratório, em consequência do esforço laboral poderá estar a influenciar a medida da função respiratória. Futuramente, este aspecto deverá ser tido em conta na avaliação do trabalhador. Numa outra perspectiva, pode-se também considerar que indivíduos com uma melhor capacidade respiratória possuam um metabolismo mais acelerado permitindo uma maior absorção de chumbo. Também é de realçar que a maior parte dos trabalhadores em que se realizou a avaliação por espirometria possuíam uma boa condição física e adaptação às condições de trabalho.

Os valores de NO para os três grupos podem ser sequenciados por ordem crescente: grupo B < grupo controlo < grupo A. Os trabalhadores da fábrica A apresentam maiores concentrações de NO no ar exalado e, igualmente, maiores níveis de chumbo no sangue do que os trabalhadores da fábrica B. No entanto, não se obtiveram correlações significativas entre estes dois parâmetros, o que poderá indicar que o NO não reflecte eventuais agressões induzidas pela inalação de metais na forma de partículas e fumos. Provavelmente, as partículas e os fumos não induzem um estímulo directo de vasoconstrição que obrigue a uma maior produção de NO ou inversamente uma vasodilatação que induza uma menor produção de NO.

No entanto, o NO exalado está relacionado com os sintomas alérgicos apresentados, tendo-se verificado aumento dos níveis de NO obtidos nos casos de rinite alérgica, sinusite e alergias. Diversos estudos demonstraram níveis elevados de NO exalado em pacientes com rinite alérgica [63,64,65]. Desta forma, pode-se concluir que a medição do NO poderá não constituir um bom indicador para a exposição a chumbo, embora seja importante avaliar a relação da concentração de NO com os metais medidos no EBC, de modo a avaliar directamente as vias respiratórias. Além disso, num contexto de avaliação individual, é mais um bioindicador do que se passa ao nível do tracto respiratório e o estudo combinado entre biomarcadores é essencial para uma avaliação individual mais rigorosa.

A medição de bioindicadores no ar exalado é relevante por permitir uma medida directa da exposição e da reactividade das vias respiratórias aos poluentes.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho não foi possível obter resultados positivos para a determinação das citocinas no EBC. Diversos aspectos poderão ser mais aprofundados na tentativa de obtenção de dados que possam levar a uma validação da técnica de análise para as citocinas. Apesar dos vários artigos publicados relativamente à medição de biomarcadores em EBC, há uma necessidade urgente de optimização e validação das técnicas de recolha e análise que poderão influenciar a determinação de parâmetros como as citocinas. O EBC é um método não-invasivo e adequado a recolhas repetidas não induzindo inflamação, como é o caso da indução da especturação e a da lavagem broncoalveolar. Neste sentido, será de extrema importância estudar a estabilidade de moléculas como as citocinas no EBC e desenvolver métodos adequados à sua determinação. De uma forma geral, os passos futuros passam por:

- i. a optimização do sistema de recolha de EBC e procedimentos relacionados com o armazenamento das amostras;
- ii. a padronização dos métodos de análise dos marcadores inflamatórios no EBC;
- iii. melhorar a sensibilidade para a detecção destes biomarcadores;
- iv. validação dos marcadores por comparação com técnicas e outros procedimentos de recolha (indução de especturação, lavagem broncoalveolar, biopsias);
- v. estabelecer parâmetros de reprodutibilidade e de intervalos de referência para os diferentes biomarcadores.

A interrelação do NO exalado com outros indicadores da matriz de EBC, tais como metais das partículas inaladas, citocinas e produtos do metabolismo oxidativo poderão contribuir para uma maior compreensão das agressões dos poluentes inalados nas vias respiratórias. Este trabalho está inserido no projecto de investigação, como referido. A integração dos dados obtidos com os resultados da avaliação ambiental e individual poderá fornecer informação adicional que não foi possível no período de realização desta tese de mestrado. Neste contexto, as variações de NO observadas deverão ser examinadas. No entanto, e tal como demonstra este trabalho, ter-se-á de investir bastante esforço na validação na metodologia de recolha e análise de metabolitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - Tong, S., Schirnding, E. and Prapamontol, T. (2000) Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization* 78 (9): 1068-1078.
- [2] - Brodtkin, E., Copes, R., Mattman, A. *et al* (2007) Lead and mercury exposures: interpretation and action. *Canadian Medical Association Journal*, 176 (1): 59 – 63.
- [3] - Gidlow, D. (2004) Lead toxicity. *Occupational Medicine* 54: 76-81.
- [4] - Toscano, C. and Guilarte, T. (2005) Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Research Reviews*, 49: 529-554.
- [5] – Moreira, F. and Moreira, J. (2004) Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Revista Panamá Salud Publica*, 15(2): 119-129.
- [6] - Labbé, R., Vreman, H. and Stevenson, D. (1999) Zinc Protoporphyrin: a metabolite with a mission. *Clinical Chemistry*, 45(12): 2060-2072.
- [7] - Lam, T., Agovino, P., Niu, X. *et al* (2007) Linkage study of cancer risk among lead-exposed workers in New Jersey. *Science of the Total Environment*, 372: 455-462.
- [8] - U.S Department of Health and Human Sciences – Lead and Lead compounds (disponível em www.ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/toc11.html, a 20/Set/2008).
- [9] - Amman, A., Scmhid, A., Scholl-Burgi, S. *et al* (2005) Breath analysis for medical diagnosis and therapeutic monitoring. *Spectroscopy Europe*, 17: 18-20.
- [10] - Cao, W. and Duan, Y. (2006) Breath analysis: potencial for clinical diagnosis and exposure assessment. *Clinical Chemistry*, 52(5): 800-811.
- [11] - Effros, R., Dunning, M., Biller, J. *et al* (2004) The promise and perils of exhaled breath condensates. *American Journal of Physiology Society*, 287: 1073-1080.
- [12] - Vogelberg, C., Kahlert, A., Würfel, C. *et al* (2008) Exhaled breath condensate nitrite – methodological problems of sample collection. *Medical Science Monitor*, 14(8): 416-422.
- [13] - McCafferty, J., Bradshaw, T., Tate, S. *et al* (2004) Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite and protein concentrations. *Thorax*, 59: 694-698.

- [14] - Rahman, I. and Kelly, F. (2003) Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research. *Free Radical Research*, 37: 1253-1266.
- [15] - Horváth, I., Hunt, J. and Barnes, P. (2005) Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *European Respiratory Journal*, 26: 523 – 548.
- [16] - Montuschi, P. and Barnes, P. (2002) Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Pharmacological Sciences*, 23: 232-237.
- [17] - Mills, P., Davies, R. and Devalia, J. (1999) Airway epithelial cells, cytokines and pollutants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160: 38-43.
- [18] - Hoffmeyer, F., Harth, V., Merget, R. *et al* (2007) Exhaled breath condensate analysis: evaluation of a methodological setting for epidemiological field studies. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58: 289-298.
- [19] - Garey, K., Neuhauser, M., Robbins, R. *et al* (2004) Markers of inflammation in Exhaled Breath Condensate of young healthy smokers. *CHEST*, 125: 22-26.
- [20] – Rosias, P., Dompeling, E., Hendriks, J. *et al* (2004) Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15: 4-19.
- [21] – Toews, G. (2001) Cytokines and the lung. *European Respiratory Journal*, 18: 3-17.
- [22] – Hunt, J. (2002) Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *Journal Allergy and Clinical Immunology*, 110: 28-34.
- [23] – Sorbera, L., Bozzo, J. and Bayes, M. (2007) Riloncept. *Drugs of the Future*, 32(5): 411.
- [24] – Bingham, C. (2002) The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *Journal of Rheumatology*, 29: 3-9.
- [25] – Dinarello, C. (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB Journal*, 8: 1314-1325.
- [26] - Filho, R. and Zilberstein, B. (2000) Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46(3): 265-271.
- [27] - Lopes, C., Fonseca, J., Silva, J. *et al* (2005) Óxido Nítrico exalado: utilização clínica na asma. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 13(1): 7-17.

- [28] – Gill, M., Graff, G., Adler, A. *et al* (2006) Validation study of fractional exhaled nitric oxide measurements using a handheld monitoring device. *Journal of Asthma*, 43:731-734.
- [29] – Robroeks, C., van de Kant, K., Jöbsis, Q. *et al* (2007) Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 37:1303 – 1311.
- [30] – Kharitonov, S. and Barnes, P. (2006) Exhaled Biomarkers. *CHEST*, 130: 1541-1546.
- [31] - Yates, D. (2001) Role of exhaled nitric oxide in asthma. *Immunology and Cell Biology*, 79: 178-190.
- [32] – Menzias, D., Nair, A. and Lipworth, B. (2007) Portable exhaled nitric oxide measurement: comparison with “the gold standard” technique. *CHEST*, 131: 410-414.
- [33] – Borril, Z., Truman, N., Morris, J. *et al* (2006) A comparison of exhaled nitric oxide measurements performed using a three different analysers. *Respiratory Medicine*, 100: 1392-1396.
- [34] – Sundblad, B. and Sahlander, K. (2006) Effect of respirators equipped with particle or particle-gas filters during exposure in a pig confinement building. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 32: 145-153
- [35] – von Essen, S., Scheppers, L., Robbins, R. *et al*. Respiratory tract inflammation in swine confinement workers studied using a induced sputum and exhaled nitric oxide. *Journal of Toxicology*, 36: 557-565
- [36] - Baraldi, E. and Carraro, S. (2006) Exhaled NO and breath condensate. *Paediatric Respiratory Reviews*, 7: 20-22
- [37] – Hibbs, J., Taintor, R. and Vavrin, Z. (1987) Macrophage cytotoxicity; Role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235: 473-476
- [38] – Asano, K., Chee, C., Gaston, B. *et al* (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *PNAS*, 91: 10089-10093
- [39] - Montuschi, P. (2002) Indirect monitoring of lung inflammation. *Nature Reviews of Drug Discovery*, 1: 238-242
- [40] – Jaeger[®] (disponível em www.jaeger-toennies.com, a 20/Out/2008)

- [41] – Alving, K., Janson, C. and Nordvall, L. (2006) Performance of a new hand-held device for exhaled nitric oxide measurement in adults and children. *Respiratory Research*, 7: 67-74
- [42] – Tufvesson, E. and Bjermer, L. (2006) Methodological improvements for measuring eicosanoids and cytokines in exhaled breath condensate. *Respiratory Medicine*, 100: 34-38
- [43] – Reis, M., Sampaio, C., Brantes, A. *et al* (2007) Human exposure to heavy metals in the vicinity of Portuguese solid waste incinerators – Part 1: Biomonitoring of Pb, Cd and Hg in blood of the general population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210: 439-446.
- [44] – Czebe, K., Barta, I., Antus, B. *et al* (2008) Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respiratory Medicine*, 102: 720-725.
- [45] – Rosias, P., Robroeks, C., Niemarkt, H. *et al* (2006) Breath condenser coating affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *European Respiratory Journal*, 28: 1036-1041.
- [46] – Liu, J., Conrad, D., Chow, S. *et al* (2007) Collection devices influence the constituents of exhaled breath condensate. *European Respiratory Journal*, 30(4): 807-808.
- [47] – Sack, U., Scheibe, R., Wotzel, M. *et al* (2006) Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry*, 69: 169-172.
- [48] – Kharitonov, S., Gonio, F., Kelly, C. *et al* (2003) Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *European Respiratory Journal*, 21: 433-438.
- [49] – Olivieri, M., Talamini, G., Corradi, M. *et al* (2006) Reference values for exhaled nitric oxide study. *Respiratory Research*, 7: 94.
- [50] – Kharitonov, S., Robbins, R., Yates, D. *et al* (1995) Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*, 152: 609-612.
- [51] – Hogman, M., Holmkvist, T., Walinder, R. *et al*. Increased nitric oxide elimination from the airways after smoking cessation. *Clinical Science*, 103: 15-19.
- [52] – Marteus, H., Mavropoulos, A., Palm, J., *et al*. Nitric oxide formation in the oropharyngeal tract: possible influence of cigarette smoking. *Nitric Oxide*, 11: 247-255.

- [53] – Robbins, R., Millatmal, T., Lassi, K. *et al.* Smoking cessation is associated with an increase in exhaled nitric oxide. *CHEST*, 112: 313-318.
- [54] – Hoyt, J., Robbins, R., Habib, M. *et al* (2003) Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells. *Experimental Lung Respiratory*, 29: 17-28.
- [55] – Su, Y., Han, W., Giraldo, C. *et al.* (1998) Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 19: 819-825.
- [56] – Haight, R., Gordon, R., Brooks, S. (2006) The effects of age on exhaled breath nitric oxide levels. *Lung*, 184: 113-119.
- [57] – Winter-de Groot, K., van der Ent, C., Prins, I. *et al* (2005) Exhaled nitric oxide: the missing link between asthma and obesity? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115: 419-420.
- [58] – Stirling, R., Kharitonov, S., Campbell, D. *et al* (1998) Increase in exhaled nitric oxide levels in patient with difficult asthma and correlation with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Thorax*, 53: 1030-1034.
- [59] – Langley, S. Goldthorpe, S., Custovic, A. *et al.* (2003) Relationship among pulmonary function, bronchial reactivity and exhaled nitric oxide in a large group of asthmatic patients. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 91: 398 – 404.
- [60] – Moeller, A., Franklin, P., Hall, G. *et al* (2005) Measuring exhaled breath condensates in infants. *Pediatric Pulmonology*, 41: 184 – 187.
- [61] – Bloemen, K., VanDenHeuvel, R. and Desager, K. (2007) Determinants of variability in exhaled breath condensate (EBC) in children. *Respiratory Medicine*, 101: 1331-1337.
- [62] – Stoleski, S., Karadzinska-bislimovska, J., Stikova, E. *et al* (2008) Adverse effects in workers exposed to inorganic lead. *Occupational effects in inorganic lead*, 59: 19-29
- [63] – Cardinale, F., Benedictis, F., Muggeo, V. *et al* (2005) Exhaled nitric oxide, total serum IgE and allergic sensitization in childhood asthma and allergic rhinitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 16: 236-242.
- [64] – Downie, S., Andersson, M., Rimmer, J. *et al* (2004) Association between nasal and bronchial symptoms in subjects with persistent allergic rhinitis. *Allergy*, 59: 320-26.

[65] – Jouaville, L., Annesi-Maesano, I., Nguyen, L. *et al* (2003) Interrelationships among asthma, atopy, rhinitis and exhaled nitric oxide in a population-based sample of children. *Clinical Experimental Allergy*, 33: 1506-1511.

8. ANEXOS

ANEXO 1

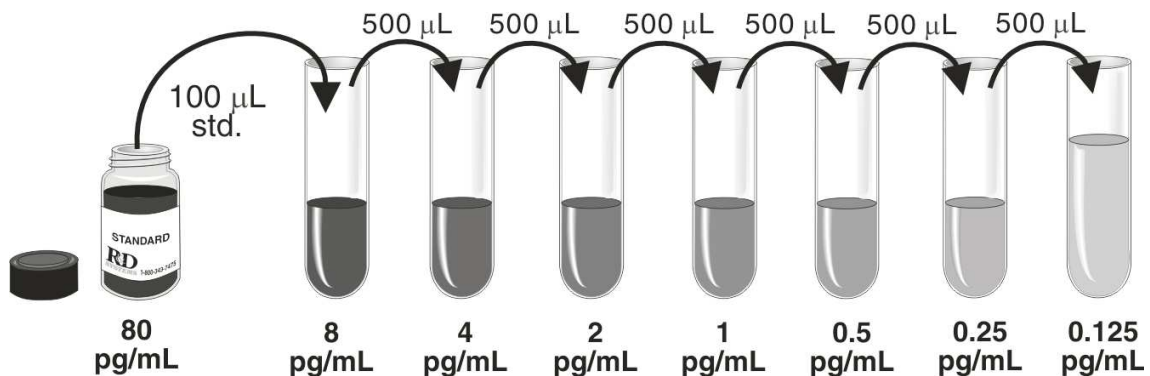
Determinação Quantitativa de IL-1 β Humana

Kit Human IL-1 β /IL-1F2 Quantikine[®] HS (R&D System)

Procedimento:

- ❖ Preparação dos reagentes:
 - ✓ Wash Buffer (tampão de lavagem) – no caso de se formarem cristais no concentrado deve-se aquecer à temperatura ambiente e misturar suavemente até os cristais se dissolverem completamente. Diluir 100 ml de tampão de lavagem concentrado em água destilada ou desionizada para preparar 100 de tampão de lavagem.
 - ✓ Substrate Solution (solução de substrato) – reconstituir o substrato liofilizado com 6,0 ml de Substrate Diluent (diluyente de substrato), pelo menos 10 minutos antes de usar.
 - ✓ Amplifier Solution (solução amplificadora) – reconstituir em 6,0 ml de Amplifier Diluent (diluyente amplificador), pelo menos 10 minutos antes de usar.
 - ✓ Standard (solução padrão) – reconstituir com 1 ml de água destilada ou desionizada. Esta solução resultante terá uma concentração de IL-1 β de 80pg/ml e sendo esta a solução stock padrão. Antes de proceder às diluições, deixar esta solução stock 15 minutos, em agitação suave.
- ❖ Preparação da série padrão de IL-1 β :

Preparar um conjunto de 7 tubos de polipropileno e proceder às diluições conforme está representado na figura seguinte. O padrão de 8 pg/ml é o padrão com maior concentração e o Calibrator Diluent (diluyente calibrador) RD6-44 servirá como o zero (0 pg/ml).



❖ Procedimento Experimental:

1. Preparar todos os reagentes de acordo com as instruções anteriores.
2. Se necessário remover os poços em excesso da microplaca e deixar apenas o número necessário para a quantificação das amostras e para os padrões da curva de calibração.
3. Adicionar 100µL de Assay Diluent (agente de diluição de ensaio) RD1-82 a cada poço.
4. Adicionar 150µL de cada amostra, padrão ou controlo por poço (fazer em duplicado). Cobrir a placa com a cobertura adesiva fornecida pelo kit e incubar 3 horas à temperatura ambiente, e colocar a placa no agitador de microplacas a 500±50 rpm.
5. Lavar a placa da seguinte forma:
 - a. remover o líquido dos poços invertendo a placa no laboratório, com água a correr;
 - b. remover o excesso de líquido invertendo a placa e batendo suavemente e firmemente com a mesma numa folha de papel limpo, pelo menos 5 vezes;
 - c. colocar em cada poço 400µL de tampão de lavagem usando uma pipeta multicanal ou um auto-dispensador;
 - d. remover o líquido invertendo a placa no laboratório, com água a correr;
 - e. repetir os passos “b”, “c” e “d” num total de 6 lavagens. Depois da última lavagem, bater suavemente com a placa numa folha de papel limpo no mínimo umas 10 vezes para remover o excesso de tampão de lavagem.
6. Adicionar 200µL de IL-1β HS Conjugate (anticorpo conjugado) a cada poço. Cobrir novamente com cobertura adesiva e incubar 2 horas, em temperatura ambiente e no agitador.
7. Repetir a lavagem como no passo 5.

8. Adicionar 50 μL de solução substrato a cada poço. Cobrir com a cobertura adesiva e incubar 1 hora, à temperatura ambiente e no agitador.
9. Adicionar 50 μL de Amplifier Solution a cada poço. Cobrir com a cobertura adesiva e incubar 30 minutos à temperatura ambiente e no agitador. Este passo vai iniciar o desenvolvimento de cor.
10. Adicionar 50 μL de Stop Solution em cada poço.

Determinar a densidade óptica de cada poço nos 30 minutos que se seguem ao passo anterior, usando um espectrofotómetro para medir as absorvâncias, a um $\lambda = 490$ nm. Se possível ler também a 650 e/ou 690 nm, para correcção; esta subtracção corrige imperfeições ópticas da placa. As medições efectuadas somente a 490 nm sem qualquer correcção podem ser mais elevadas e menos precisas.

ANEXO 2

Determinação Quantitativa de TNF- α Humana

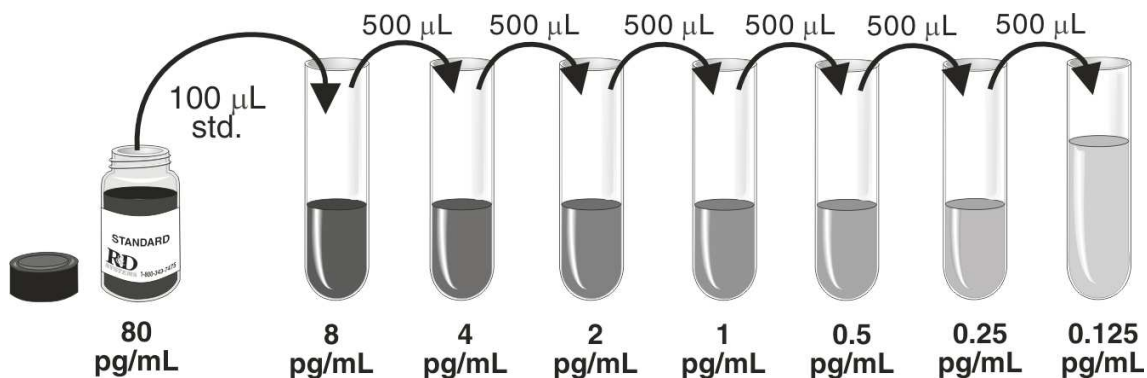
Kit Human TNF- α /TNFSF1A Quantikine[®] HS (R&D Systems)

Procedimento:

- ❖ Preparação dos reagentes:
 - ✓ Wash Buffer (tampão de lavagem) - no caso de se formarem cristais no concentrado deve-se aquecer à temperatura ambiente e misturar suavemente até os cristais se dissolverem completamente. Diluir 100 ml de tampão de lavagem concentrado em água destilada ou desionizada para preparar 1000 ml de tampão de lavagem.
 - ✓ Substrate Solution (solução de substrato) – reconstituir o substrato liofilizado com 6,0 ml de Substrate Diluent (diluyente de substrato), pelo menos 10 minutos antes de usar.
 - ✓ Amplifier Solution (solução amplificadora) – reconstituir em 6,0 ml de Amplifier Diluent (diluyente amplificador), pelo menos 10 minutos antes de usar.
 - ✓ TNF- α Standard (solução padrão) – reconstituir com 1 ml de água destilada ou desionizada. Esta solução resultante terá uma concentração de IL-1 β de 80pg/ml e sendo esta a solução stock padrão. Antes de proceder às diluições, deixar esta solução stock 15 minutos, em agitação suave.

- ❖ Preparação da série padrão de IL-1 β :

Preparar um conjunto de 7 tubos de polipropileno e proceder às diluições conforme está representado na figura seguinte. O padrão de 8 pg/ml é o padrão com maior concentração e o Calibrator Diluent (diluyente calibrador) RD6-44 servirá como o zero (0 pg/ml).



❖ Procedimento Experimental:

1. Preparar todos os reagentes de acordo com as instruções anteriores.
2. Se necessário remover os poços em excesso da microplaca e deixar apenas o número necessário para a quantificação das amostras e para os padrões da curva de calibração.
3. Adicionar 100µL de Assay Diluent (agente de diluição de ensaio) RD1-82 a cada poço.
4. Adicionar 150µL de cada amostra, padrão ou controlo por poço (fazer em duplicado). Cobrir a placa com a cobertura adesiva fornecida pelo kit e incubar 3 horas à temperatura ambiente, e colocar a placa no agitador de microplacas a 500±50 rpm.
5. Lavar a placa da seguinte forma:
 - a. remover o líquido dos poços invertendo a placa no lavatório, com água a correr;
 - b. remover o excesso de líquido invertendo a placa e batendo suavemente e firmemente com a mesma numa folha de papel limpo, pelo menos 5 vezes;
 - c. colocar em cada poço 400µL de tampão de lavagem usando uma pipeta multicanal ou um auto-dispensador;
 - d. remover o líquido invertendo a placa no lavatório, com água a correr;
 - e. repetir os passos “b”, “c” e “d” num total de 6 lavagens. Depois da última lavagem, bater suavemente com a placa numa folha de papel limpo no mínimo umas 10 vezes para remover o excesso de tampão de lavagem.
 - f. Adicionar 200µL de IL-1β HS Conjugate (anticorpo conjugado) a cada poço. Cobrir novamente com cobertura adesiva e incubar 2 horas, em temperatura ambiente e no agitador.
 - g. Repetir a lavagem como no passo 5.
6. Adicionar 50 µL de solução substrato a cada poço. Cobrir com a cobertura adesiva e incubar 1 hora, à temperatura ambiente e no agitador.

7. Adicionar 50 μ L de Amplifier Solution a cada poço. Cobrir com a cobertura adesiva e incubar 30 minutos à temperatura ambiente e no agitador. Este passo vai iniciar o desenvolvimento de cor.
8. Adicionar 50 μ L de Stop Solution em cada poço.
9. Determinar a densidade óptica de cada poço nos 30 minutos que se seguem ao passo anterior, usando um espectofotómetro para medir as absorvâncias, a um $\lambda = 490$ nm. Se possível ler também a 650 e/ou 690 nm, para correcção; esta subtração corrige imperfeições ópticas da placa. As medições efectuadas somente a 490 nm sem qualquer correcção podem ser mais elevadas e menos precisas.

ANEXO 3

Testes de normalidade

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Sexo	2	,396	26	,000	,619	26	,000
	3	,395	36	,000	,619	36	,000
Idade	1	,146	19	,200*	,969	19	,753
	2	,167	26	,061	,940	26	,131
	3	,109	36	,200*	,974	36	,540
Antiguidade	1	,171	19	,148	,859	19	,010
	3	,235	36	,000	,869	36	,001
Fumador	1	,403	19	,000	,616	19	,000
	2	,416	26	,000	,604	26	,000
	3	,367	36	,000	,633	36	,000
Pb_sangue	1	,124	16	,200*	,962	16	,690
	3	,169	18	,188	,903	18	,066
IMC	1	,131	14	,200*	,951	14	,583
Hx_alergias	1	,525	19	,000	,362	19	,000
	2	,456	19	,000	,555	19	,000
	3	,504	36	,000	,451	36	,000
NO	1	,306	14	,001	,810	14	,007
	2	,177	19	,120	,738	19	,000
	3	,242	28	,000	,656	28	,000
FVC	1	,273	14	,006	,854	14	,025
FVC_perc	1	,266	14	,008	,784	14	,003
FEV1	1	,170	14	,200*	,975	14	,933
FEV1_perc	1	,115	14	,200*	,968	14	,847
FEV1_FVC	1	,197	14	,146	,954	14	,630
FEV1_FVC_perc	1	,185	14	,200*	,904	14	,129
FEF50	1	,081	14	,200*	,976	14	,949
FEF50_perc	1	,086	14	,200*	,986	14	,996

médiaEBCrecolhido	1	,078	15	,200*	,986	15	,994
	2	,156	25	,119	,956	25	,337
	3	,089	36	,200*	,981	36	,768
média_min	1	,162	15	,200*	,950	15	,517
	2	,144	25	,196	,958	25	,374
	3	,071	36	,200*	,980	36	,760

*. This is a lower bound of the true significance.