



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ARNALDO JORGE RODRIGUES FIGUEIREDO

*Mediadores Inflamatórios no Condensado de Ar Exalado na Sarcoidose:
Estudo Preliminar*

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE PNEUMOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professor Doutor CARLOS MANUEL SILVA ROBALO CORDEIRO

Doutor TIAGO MANUEL POMBO ALFARO

MARÇO DE 2018

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO CONDENSADO DE AR EXALADO NA SARCOIDOSE: ESTUDO PRELIMINAR

Arnaldo Figueiredo¹, Tiago M Alfaro^{1,2}, Eulália Costa³, Fernando Rodrigues³, Carlos Robalo Cordeiro^{1,2}

1. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal
2. Serviço de Pneumologia A, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal
3. Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

Email: arnaldofigueiredo94@gmail.com

ÍNDICE

RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	7
MATERIAIS E MÉTODOS	11
Amostra populacional.....	11
Colheita e processamento das amostras	11
Recolha de dados clínicos	12
Análise laboratorial	12
Estudo estatístico.....	13
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO.....	18
ANEXOS.....	24

RESUMO

A sarcoidose é uma doença granulomatosa sistêmica de etiologia desconhecida com predileção pelo envolvimento do aparelho respiratório e gânglios linfáticos. Tem um curso variável, não existindo uma forma fácil de avaliar a sua atividade, prognóstico ou necessidade de terapêutica. A análise do condensado do ar exalado (CAE) é uma técnica segura e totalmente não-invasiva de colheita de substâncias provenientes das vias aéreas inferiores. Tem sido muito utilizada na avaliação da fisiologia e fisiopatologia das vias respiratórias inferiores face à facilidade com que pode ser recolhido em qualquer idade ou gravidade de doença respiratória. O objetivo deste estudo foi a identificação de novos biomarcadores da atividade de sarcoidose, mensuráveis no condensado de ar exalado e que permitam avaliar o seu risco de progressão.

Realizámos um estudo transversal em doentes com sarcoidose sendo colhidos dados clínicos, laboratoriais, funcionais e imagiológicos. Realizámos ainda uma colheita de amostra de condensado do ar exalado na qual quantificámos o cálcio, a proteína c-reativa (PCR) e a enzima de conversão da angiotensina (ECA).

Incluímos um total de 14 doentes (6 homens e 8 mulheres), com uma idade média de $51,5 \pm 11,8$ anos. A massa média da amostra recolhida foi de 425 ± 257 mg nas mulheres e de 767 ± 515 mg nos homens. A PCR foi apenas mensurável numa das amostras. O valor médio de cálcio no CAE foi de $0,79 \pm 0,61$ mg/dL e a ECA média foi de $0,86 \pm 1,03$ U/L. Encontrámos uma correlação positiva entre o cálcio no CAE e a massa da amostra ($p=0,032$; Pearson) e entre a ECA no CAE e os neutrófilos no lavado bronco-alveolar ($p=0,035$; Pearson). Este estudo demonstra que é possível avaliar marcadores inflamatórios no CAE de doentes com sarcoidose. Sendo o CAE uma técnica não-invasiva, de baixo custo e rápida execução, a descoberta de marcadores que permitam a monitorização da sua evolução, pode ser um fator importante na melhoria da avaliação clínica do doente com sarcoidose. **Palavras chave:** Sarcoidose, Condensado de Ar Exalado, Cálcio, Enzima de Conversão da Angiotensina

ABSTRACT

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown etiology which typically affects the lungs and lymphatic nodes. It has a variable clinical course and there is no simple way of evaluating its activity, prognosis or need for treatment. Exhaled breath condensate (EBC) analysis is a safe and totally non-invasive procedure which allows the research of substances from the lower respiratory-tract. This technique has been extensively used to evaluate physiology and pathophysiology of the lower respiratory-tract due to the ease with which it is performed regardless of age or severity of disease. The purpose of this study was the identification of novel biomarkers of sarcoidosis activity, that can be measured in exhaled breath condensate and that allow the evaluation of its progression risk.

We performed a cross-sectional study in patients with sarcoidosis, collecting clinical, analytical, functional and imaging data. We also performed EBC liquid collection, which was sampled for calcium, c-reactive protein (CRP) and angiotensin-converting enzyme (ACE) values.

We included a total of 14 patients (6 men and 8 women), with an average age of $51,5 \pm 11,8$ years. The average mass of the collected samples was 425 ± 257 mg in women and 767 ± 515 mg in men. PCR values were only measurable in 1 sample. The average value of calcium in EBC was $0,79 \pm 0,61$ mg/dL and average ACE was $0,86 \pm 1,03$ U/L. We found a positive correlation between calcium values in EBC and lower sample mass ($p=0,032$; Pearson) and between ACE values in EBC neutrophils in broncho-alveolar lavage fluid ($p=0,035$; Pearson). This study demonstrates that it is possible to ascertain inflammatory marker values in EBC of patients with sarcoidosis. As EBC liquid collection is a non-invasive, low-cost and fast execution technique, the discovery of disease markers with high correlation with prognosis and severity, allowing the monitoring of disease progression, may be an important factor in the

improvement of clinical evaluation in patients with sarcoidosis. **Keywords:** Sarcoidosis, Exhaled Breath Condensate, Calcium, Angiotensin-Converting Enzyme

INTRODUÇÃO

A sarcoidose é uma doença granulomatosa sistêmica de etiologia desconhecida com uma incidência anual global de 10/100.000 habitantes/ano (1) e predileção pelo aparelho respiratório e gânglios linfáticos. Apesar de apresentar envolvimento torácico em 90% dos doentes, pode envolver praticamente todos os sistemas, incluindo cutâneo (30% dos pacientes), ocular (25% dos pacientes) e cardíaco (25% dos pacientes), entre outras localizações (2). O desenvolvimento de granulomas não-caseosos composto por macrófagos, células epitelioides e linfócitos T CD4+ representa a alteração histológica típica da doença, embora não seja específica, podendo estar presentes em diversas doenças inflamatórias (3,4). Estes granulomas inflamatórios levam a distorção da arquitetura local, lesão tecidual e, por vezes, fibrose irreversível que causam compromisso respiratório com tosse, dispneia e sibilância. O mecanismo patológico responsável pela formação da fibrose não é bem conhecido, embora se suspeite que o aumento da atividade do fator de transformação do crescimento β (TGF- β), alterações fenotípicas dos macrófagos e uma transição de linfócitos Th1 para Th2 possam estar envolvidos (5). Embora possa ter início em qualquer faixa etária, ocorre predominantemente entre a 3ª e a 4ª década de vida, sendo que 1/3 dos doentes evolui para cronicidade (2).

Pela sua predileção pelos pulmões, pele e olhos, foi suscitado que a sarcoidose fosse causada por um agente inspirado. No entanto, apesar de diversos estudos etiológicos de larga escala, não foi possível isolar um fator ambiental ou ocupacional único (2). Estudos recentes acerca da sua etiologia apontam para a possibilidade de a sarcoidose ser desenvolvida na sequência de exposição a um agente (não identificado) em indivíduos geneticamente suscetíveis (6).

A grande variabilidade de apresentação da doença aponta para a possibilidade de esta não ser uma entidade nosológica única, mas sim um conjunto de patologias tipo-sarcoidose, o que pode explicar a dificuldade em encontrar um agente etiológico único ou alterações genéticas específicas da doença (7).

O diagnóstico é estabelecido pela apresentação clínica e radiológica típicas, pela confirmação histológica da presença de granulomas não-caseosos e exclusão de outras causas (8). Esta doença representa assim um diagnóstico de exclusão, sendo que, segundo alguns estudos, os casos detetados na 1ª consulta apenas perfazem 15,3% do total (8).

Sendo uma doença com apresentação variada, o tratamento é abordado caso-a-caso. Uma percentagem significativa dos pacientes não necessita de tratamento sistémico, enquanto nos restantes, a terapêutica com corticoides mantém-se como a primeira linha. Diversas estratégias foram empregues para reduzir o uso de corticoides, incluindo o uso de imunomoduladores como o metotrexato e terapêuticas biológicas, como o infliximab e o rituximab (9). Aproximadamente 1-5% dos portadores da doença falecem por complicações da mesma, mais comumente por insuficiência respiratória condicionada por processos de fibrose pulmonar ou por envolvimento cardíaco ou neurológico (3).

A sarcoidose cursa muitas vezes com alterações do metabolismo do cálcio, sendo que 2-27% dos doentes desenvolvem hipercalcemia, que pode levar ao desenvolvimento de insuficiência renal. O mecanismo subjacente ao aumento dos níveis séricos de cálcio aparenta ser multifatorial, sendo que um dos fatores mais frequentemente envolvido é o aumento da actividade da 1-alfa hidroxilase, responsável pela conversão da vitamina D3 25-(OH) em vitamina D3 1,25-(OH), a sua forma ativa, podendo, no entanto, haver um aumento do cálcio sérico sem haver um aumento sérico correspondente de vitamina D. Outra alteração mais rara relacionada com o desenvolvimento de hipercalcemia é o aparecimento de adenomas da paratiroide, com hiperparatiroidismo (10).

A enzima de conversão da angiotensina (ECA) tem sido utilizada como um marcador inflamatório de atividade da doença, apresentando valores aumentados em 30-80% dos doentes. Segundo um estudo realizado por Güngör S. et al., esta apresenta especificidade e sensibilidade de 72% e 60% respetivamente (11). Um estudo anterior procurou encontrar uma relação entre

polimorfismos da ECA e suscetibilidade de desenvolver sarcoidose, tendo encontrado uma relação positiva em populações europeias e da Ásia Oriental (12).

A tomografia de emissão de positrões com F18-fludesoxiglucose (PET-F18-FDG) é uma exame de medicina nuclear utilizada na sarcoidose para avaliar o grau de atividade da doença, monitorizar a resposta à terapêutica e localizar focos ocultos de atividade da doença. O seu mecanismo baseia-se na captação aumentada de F18-FDG por células inflamatórias ativas, nomeadamente macrófagos, permitindo localizar focos de processos inflamatórios, como é o caso da sarcoidose (13).

O condensado do ar exalado é uma técnica segura e totalmente não-invasiva de colheita e análise de substâncias provenientes das vias aéreas inferiores. Pode ser usada em todas as idades e graus de gravidade de doença e tem sido utilizada para avaliar a presença de doença, o seu prognóstico e a própria fisiologia normal das vias respiratórias inferiores (14).

Durante a colheita do condensado do ar exalado, o fluxo respiratório é dirigido por uma coluna de arrefecimento a -10°C, o que resulta na formação de um condensado na fase líquida ou sólida que se acumula num recipiente na base da coluna (14). Uma barreira física (*saliva trap*) impede a saliva de se misturar com o líquido colhido e o uso de uma pinça nasal previne a contaminação da amostra com detritos provenientes das vias nasais.

O conteúdo do líquido colhido é constituído maioritariamente por vapor de água condensado (> 99% do líquido colhido). Uma pequena fração corresponde a gotículas respiratórias que contêm moléculas não-voláteis (tanto hidrofóbicas quanto solúveis).

O líquido colhido é representativo do líquido de revestimento das vias aéreas inferiores (15).

Já foram realizados vários estudos acerca do uso do condensado do ar exalado no diagnóstico e monitorização da sarcoidose, focados na pesquisa de marcadores de atividade de macrófagos alveolares e de marcadores inflamatórios inespecíficos (16–19).

Este estudo pretende identificar novos biomarcadores não invasivos da atividade de sarcoidose, nomeadamente mensuráveis no condensado de ar exalado e que permitam prever a atividade e risco de progressão da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra populacional

Foi realizado um estudo transversal em doentes com diagnóstico de sarcoidose seguidos na consulta do interstício pulmonar do Serviço de Pneumologia A do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Os critérios de inclusão foram o diagnóstico estabelecido de Sarcoidose. Os critérios de exclusão foram a gravidez, idade inferior a 18 anos, inimputabilidade e o não consentimento. O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética do CHUC (processo número CHUC-070-17). Os doentes foram contactados por via telefónica sendo-lhes explicado o estudo que iria ser realizado, com os possíveis benefícios ou riscos associados, sendo solicitado que se deslocassem ao Serviço de Pneumologia A do CHUC.

Colheita e processamento das amostras

A colheita de condensado de ar exalado foi realizada com recurso a um dispositivo Jaeger EcoScreen (Erich Jaeger, Hoechberg, Alemanha). Após leitura do formulário de informação do estudo e assinatura do consentimento informado escrito, foi realizada a colheita das amostras de condensado de ar exalado. Os participantes eram instruídos para se sentarem confortavelmente em frente à máquina, colocando uma pinça nasal, e respirarem calmamente para um bucal esterilizado durante 15 minutos. O líquido recolhido foi então preservado numa arca a -80°C até à data de análise.

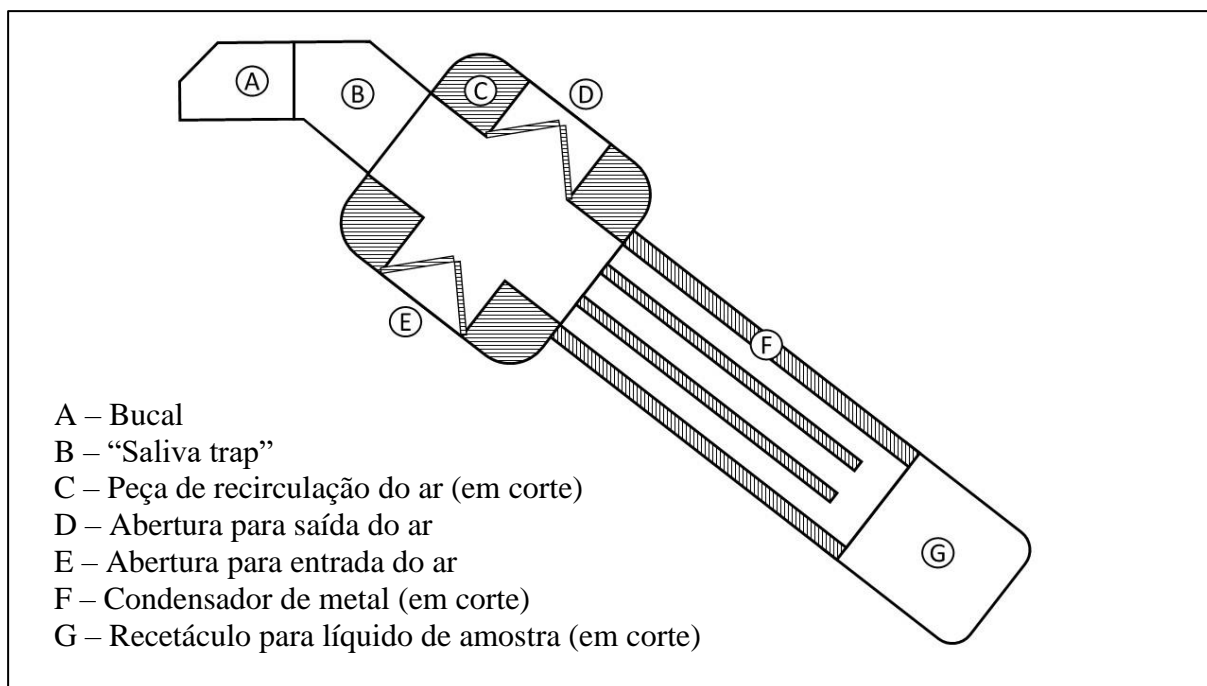


Figura 1 – Esquema do dispositivo de colheita de condensado de ar exalado utilizado neste estudo

Recolha de dados clínicos

A recolha de dados clínicos, imagiológicos (adaptação do estadiamento de Scadding para tomografia computadorizada (20)), laboratoriais e funcionais dos participantes foi realizada através da consulta dos processos individuais.

Análise laboratorial

Todas as amostras foram analisadas em conjunto. O tempo de congelação variou entre 54 e 84 dias. Para pesquisa da enzima de conversão da angiotensina (ECA), foi utilizado um kit da empresa Trinity Biotech (Wicklow, Irlanda) para estudo enzimático. A medição dos valores de cálcio e da proteína c-reativa (PCR) foi realizada com recurso a um dispositivo AU5840 da Beckman Coulter (Brea, Califórnia, EUA). Os valores de cálcio e de PCR foram aferidos por estudo colorimétrico de ponto final por arsenazo III e por imunoturbidimetria, respetivamente.

Estudo estatístico

Foi criada uma base de dados anonimizada, contendo os dados clínicos, analíticos, imagiológicos, funcionais, assim como da análise do condensado, que foi consultada apenas por profissionais de saúde envolvidos no estudo.

A análise estatística foi realizada utilizando o software STATA versão 13.1 (STATA Corp., College Station, EUA). As variáveis contínuas foram caracterizadas usando medidas de tendência central (média ou mediana) e de dispersão (desvio padrão ou intervalo interquartil). As variáveis categóricas foram caracterizadas usando medidas de proporção (%). Para o estudo da normalidade utilizámos o teste de Shapiro-Wilk e de Kolgomorov-Smirnov. Para comparação de médias utilizámos o teste de t de Student ou o teste de Mann-Whitney, de acordo com a normalidade. Para o estudo da correlação, utilizámos o teste de Spearman ou de Pearson, de acordo com a normalidade. As diferenças entre proporções foram testadas através do teste to qui quadrado. Todas as análises foram realizadas para uma significância de 95% a duas caudas ($p < 0.05$).

RESULTADOS

A população consistiu em 14 participantes (6 homens e 8 mulheres), com uma idade média de $51,5 \pm 11,8$ anos. Destes, oito negavam hábitos tabágicos e seis referiam ser ex-fumadores. Os dados demográficos, imagiológicos, funcionais e analíticos encontram-se detalhados na tabela 1.

População (n)	14
Género feminino	8
Idade (anos)	$51,5 \pm 11,8$
Tabaco (n=14)	
Nunca fumador	8
Ex-Fumador	6
Provas Funcionais (n=12)	
FEV1 (% do previsto)	$96,4 \pm 16,0$
FVC (% do previsto)	$101,0 \pm 14,1$
FEV1/FVC (% do previsto)	$80,0 \pm 6,6$
DLCO-SB (% do previsto)	$93,3 \pm 26,2$
Estadio imagiológico (TC) (n=14)	
Estadio 0	2
Estadio II	7
Estadio III	4
Estadio IV	1
Lavado Bronco-Alveolar (n=11)	
Contagem celular total (cél/ μ L)	$119,8 \pm 108,8$
Linfócitos (%)	$36,1 \pm 20,2$
Neutrófilos (%)	$3,0 \pm 5,1$
Macrófagos (%)	$58,2 \pm 20,7$
CD4/CD8	$3,9 \pm 2,2$
CD4/CD8 no soro (n=11)	$1,2 \pm 0,8$
Cálcio sérico (mg/dL) (n=12)	$9,5 \pm 0,3$
ECA sérica (U/L) (n=10)	$36,2 \pm 24,0$
PCR sérica (mg/dL) (n=11)	$0,7 \pm 1,3$

Tabela 1 – Dados demográficos, clínicos, imagiológicos, funcionais e analíticos da população

Dos 12 doentes que tinham realizado provas funcionais por espirometria, apenas 1 tinha valores alterados, compatíveis com um quadro obstrutivo. Todos os doentes se encontravam estadiados imagiologicamente por tomografia computadorizada do tórax, sendo que nove doentes se encontravam em estadio menor ou inferior a II e cinco em estadio superior. Da amostra populacional, 12 tinham valores prévios de cálcio sérico, com um valor médio de $9,5 \text{ mg/dL} \pm 0,3 \text{ mg/dL}$, 10 tinham valores prévios de ECA sérica, com um valor médio de $36,2 \text{ U/L} \pm 23,9 \text{ U/L}$ e 11 tinham valores prévios de PCR sérica, com um valor médio de $0,7 \text{ mg/dL} \pm 1,3 \text{ mg/dL}$. Os resultados de broncoscopia com lavado bronco-alveolar estavam disponíveis em 11 doentes. Destes, a relação CD4/CD8 estava disponível em 10, sendo que 5 tinham valores superiores ou iguais a 3,5 com um valor médio de $3,9 \pm 2,2$.

Sete dos doentes tinham resultados de PET-F18-FDG no processo. Deste, dois não apresentavam alterações compatíveis com doença. Dos restantes, dois apresentavam adenopatias isoladas e três adenopatias associadas a hipercaptação pulmonar compatível com envolvimento por sarcoidose.

Estudo do ar exalado

Nas colheitas que realizámos foi produzido uma massa média de amostra de $571 \pm 410 \text{ mg}$ para um tempo de colheita de 15 minutos. Os resultados da quantificação de cálcio e enzima conversora de angiotensina no condensado encontram-se detalhados na tabela 2.

	Cálcio (mg/dL)	ECA (U/L)
Total (n=14)	0,79 ± 0,61	0,86 ± 1,03
Género		
Feminino (n=8)	1,03 ± 0,68	1,00 ± 0,96
Masculino (n=6)	0,48 ± 0,34	0,67 ± 1,21
Idade		
<51,5 (n=9)	0,93 ± 0,69	1,00 ± 1,12
≥51,5 (n=5)	0,54 ± 0,36	0,60 ± 0,89
Massa da amostra		
<571 mg (n=10)	1,04 ± 0,62	0,78 ± 0,97
≥571 mg (n=4)	0,34 ± 0,23	1,00 ± 1,22
Hábitos tabágicos		
Nunca (n=8)	0,83 ± 0,78	1,13 ± 1,25
Ex-Fumador (n=6)	0,75 ± 0,33	0,50 ± 0,55
PET-F18-FDG		
Sem envolvimento^a (n=4)	1,13 ± 0,63	0,75 ± 0,96
Com envolvimento^b (n=3)	0,53 ± 0,40	0,33 ± 0,58
CD4/CD8 (no LBA)		
<3,5 (n=5)	1,06 ± 0,72	1,20 ± 1,30
≥3,5 (n=5)	0,80 ± 0,68	0,40 ± 0,89
Estadio imagiológico		
≤ II (n=9)	0,71 ± 0,59	0,78 ± 1,09
> II (n=5)	0,94 ± 0,69	1,00 ± 1,00

Tabela 2 – Valores obtidos da amostra de CAE em relação com dados obtidos dos processos individuais (a - sem evidência na PET-F18-FDG de envolvimento pulmonar; b - com evidência na PET-F18-FDG de envolvimento pulmonar)

Não foram detetados valores mensuráveis de PCR nas amostras de CAE colhidas exceto numa amostra em que foram detetados 0,01mg/dL. Os valores de massa da amostra no género feminino e no género masculino foram de 425 ± 257 mg e de 767 ± 515 mg respetivamente. Não foi encontrada correlação entre os valores no soro e na amostra de CAE de cálcio $p = 0,140$, (Pearson) ou ECA, $p = 0,460$ (Pearson). Encontrámos correlação com significância entre o valor

de cálcio na amostra de CAE e a massa da amostra ($p=0,032$; Pearson), com valores mais altos nas amostras de menor massa. Também encontramos uma relação positiva e estatisticamente significativa entre a percentagem de neutrófilos no LBA e o valor de ECA na amostra de CAE ($R^2=0.63$; $p=0,035$; Pearson).

O estudo revelou uma tendência para valores mais elevados de cálcio na amostra de CAE no género feminino, não apresentando, no entanto, significância estatística ($p=0,1$; t de Student).

DISCUSSÃO

Existem poucos estudos acerca do uso do condensado do ar exalado na sarcoidose, sendo que apenas um número limitado de marcadores foi avaliado. Os que foram não estão bem documentados e ainda não revelaram correlações robustas que permitam o seu uso como ferramentas para o seguimento da doença. Neste estudo procurámos contribuir para o desenvolvimento deste tema.

No estudo das amostras de CAE, observámos que os valores de ECA no soro e no CAE não apresentam uma relação direta entre si. No entanto, ao contrário de estudos anteriores em que foram detetados valores de ECA numa baixa percentagem da população (16), neste foi detetado ECA no líquido do CAE em todos os doentes, com uma grande amplitude nos valores ($0,86 \pm 1,03$ U/L). Tendo em conta que o CAE é representativo do líquido de revestimento das vias aéreas inferiores, este achado pode dever-se a diferenças na regulação da ECA no soro e no líquido de revestimento das vias aéreas inferiores. Assim sendo, poder-se-á admitir que existem fatores fisiopatológicos que influenciem o valor de ECA no condensado do ar exalado. Um estudo com uma população controlo que permita estabelecer um valor representativo da normalidade poderá pôr em evidência alterações compatíveis com atividade da sarcoidose.

Encontrámos uma correlação positiva entre valores elevados de ECA nas amostras de CAE e valores percentuais elevados de neutrófilos no LBA. A sarcoidose está associada mais commumente com valores elevados de ECA e com um nível aumentado de linfócitos no LBA, com valores normais de neutrófilos e eosinófilos, pelo que estes achados aparentam contradizer as alterações características da doença. No entanto, é de salientar que os valores das contagens celulares no líquido de LBA apresentam grande variabilidade interindividual (21), podendo estes resultados ter sido condicionados pela pequena dimensão da amostra populacional.

Os valores de cálcio no soro e nas amostras de CAE também não apresentam uma relação direta entre si. Isto poderá dever-se a mecanismos semelhantes aos responsáveis pela ausência de

relação entre a ECA no soro e no CAE. O valor médio de cálcio registado nas amostras de CAE foi de $0,79 \pm 0,61$ mg/dL. A existência de variabilidade entre diferentes amostras pode aqui também indicar a possibilidade de caracterização de variações compatíveis com atividade da doença em função da definição de um valor padrão de normalidade deste ião no CAE.

Encontrámos uma correlação positiva entre valores baixos de massa da amostra de CAE e valores altos de cálcio no CAE. Também encontrámos uma tendência para valores mais elevados de cálcio no CAE no género feminino em comparação com o género masculino ($1,03 \pm 0,68$ mg/dl versus $0,48 \pm 0,34$ mg/dL). Podemos especular que o género feminino apresenta valores menores de volume da amostra, que poderão levar a uma maior concentração e valores mais elevados de cálcio no CAE. No entanto, apesar de os doentes do género feminino apresentarem valores médios de volume da amostra inferiores aos do género masculino (425 ± 258 mg e 767 ± 515 mg respetivamente), essa diferença não foi significativa.

Apenas uma amostra apresentou valores quantificáveis de PCR ($0,01$ mg/dL). Devido à ausência de estudos anteriores que meçam o nível de PCR em amostras de CAE, não foi possível aferir se estes achados são normais ou alterações devidas à presença de um processo patológico. No entanto, o uso de técnicas diferentes para a quantificação da PCR no CAE poderá, porventura, ser capaz de detetar a sua presença, algo que se poderia revelar de interesse, dado tratar-se de um marcador inespecífico de atividade inflamatória.

Neste estudo tivemos como limitações uma amostra populacional ser reduzida e unicêntrica. Nenhum doente tinha valores de cálcio séricos fora da faixa do normal, sendo que isso poderá ter limitado o uso do cálcio como marcador efetivo de atividade da doença. Para além disso, dificultou a criação de correlações entre o cálcio no CAE com os valores séricos e com outros fatores de avaliação do estadio da doença, como as provas funcionais, o estadio imagiológico e os resultados da PET-F18-FDG.

O facto de a população ser bem caracterizada a nível imagiológico, funcional e analítico constitui uma vantagem deste estudo. Avaliámos a presença de PCR, um componente que, tanto quanto é do nosso conhecimento, nunca foi procurado no CAE.

Uma perspetiva futura para a análise do CAE no nosso serviço é a aferição do valor de pH, um marcador robusto e reprodutível de acidez das vias aéreas. A acidez das vias aéreas tem forte relação com outros marcadores de inflamação das vias aéreas, podendo ser utilizado para prever processos patológicos de carácter inflamatório (22).

O estudo de outros componentes iónicos, como o sódio, o potássio e o cloro, poderá revelar novas informações acerca da composição do líquido do CAE na sarcoidose.

Em conclusão, este estudo demonstra que é possível pesquisar marcadores inflamatórios não específicos no CAE em doentes com sarcoidose. Sendo a colheita de CAE uma técnica não-invasiva, de baixo custo e de rápida execução, a descoberta de alterações com relação com o prognóstico e gravidade da doença, que permitam a monitorização da sua evolução, pode ser um fator importante na melhoria do acompanhamento e da qualidade de vida dos doentes com sarcoidose.

BIBLIOGRAFIA

1. Ungprasert P, Carmona EM, Utz JP, Ryu JH, Crowson CS, Matteson EL. Epidemiology of Sarcoidosis 1946-2013: A Population-Based Study. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(2):183–8.
2. Iannuzzi MC, Fontana JR. Sarcoidosis: Clinical Presentation, Immunopathogenesis and Therapeutics. *JAMA.* 2011;305(4):391–9.
3. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Medical Progress: Sarcoidosis. *N Engl J Med.* 2007;357:2153–65.
4. Baughman RP, Culver DA, Judson MA. A concise review of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care.* 2011;183(5):573–81.
5. Patterson KC, Streck ME. Pulmonary fibrosis in sarcoidosis clinical features and outcomes. *Ann Am Thorac Soc.* 2013;10(4):362–70.
6. Spagnolo P, Grunewald J. Recent advances in the genetics of sarcoidosis. *J Med Genet.* 2013;50(5):290–7.
7. Spagnolo P. Sarcoidosis: a Critical Review of History and Milestones. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2015;49(1):15–9.
8. Judson MA, Thompson BW, Rabin DL, Steimel J, Knatterud GL, Lackland DT, et al. The diagnostic pathway to sarcoidosis. *Chest.* 2003;123(2):406–12.
9. Baughman RP, Lower EE. Treatment of Sarcoidosis. *Clinic Ver Allerg Immunol.* 2015;49:79–92.
10. Baughman RP, Janovcik J, Ray M, Sweiss N, Lower EE. Calcium and vitamin D metabolism in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffus Lung Dis.* 2013;30(11):113–20.
11. Gungor S, Ozseker F, Yalcinsoy M, Akkaya E, Can G, Eroglu H, et al. Conventional markers in determination of activity of sarcoidosis. *Int Immunopharmacol.* 2015;25(1):174–9.

12. Song GG, Kim JH, Lee YH. Associations between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and susceptibility to sarcoidosis: A meta-analysis. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2015;16(1):219–26.
13. Sobic-Saranovic D, Artiko V, Obradovic V. FDG PET imaging in sarcoidosis. *Semin Nucl Med.* 2013;43(6):404–11.
14. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26(3):523–48.
15. Di Venere M, Viglio S, Cagnone M, Bardoni A, Salvini R, Iadarola P. Advances in the analysis of “less-conventional” human body fluids: An overview of the CE- and HPLC-MS applications in the years 2015-2017. *Electrophoresis.* 2017;1–38.
16. Ahmadzai H, Cameron B, Chui J, Lloyd a, Wakefield D, Thomas PS. Measurement of neopterin, TGF-beta1 and ACE in the exhaled breath condensate of patients with sarcoidosis. *J Breath Res.* 2013;7(4):46003.
17. Mohan N, Akter R, Bryant K, Herbert C, Chow S, Thomas PS. Exhaled breath markers of alveolar macrophage activity in sarcoidosis. *Inflamm Res.* 2016;65(6):471–8.
18. Piotrowski WJ, Bieńkiewicz M, Frieske I, Marczak J, Antczak A, Górski P, et al. Somatostatin receptor scintigraphy in sarcoidosis: relation to selected clinical and laboratory markers. *Pol Arch Med Wewnętrznej.* 2012;122(3):98–106.
19. Natalie ST, Cristan H, Paul TS. Immunopathogenesis and the use of Exhaled Breath Condensate Analysis in Sarcoidosis. *Journal of Applied Medical Sciences.* 2014;3(4):1–18.
20. Costa IC, Alfaro TM, Cunha RA, Robalo-Cordeiro C. A Preliminary Study on the Effect of Caffeine Consumption on the Evolution of Sarcoidosis. 2011;1(4):206–12.

21. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007;28(5):486–95.
22. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Turner R, Nguyen TA, Smith A, et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J.* 2003;22(6):889–94.

ANEXOS

Anexo 1

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO CONDENSADO DE AR EXALADO NA SARCOIDOSE: ESTUDO PRELIMINAR – DOCUMENTO INFORMATIVO

Âmbito do estudo: Devido à variabilidade de apresentação da sarcoidose, a avaliação da gravidade e risco de progressão é difícil, recorrendo-se habitualmente exames caros, demorados e por vezes invasivos. Este estudo propõe a realização de um exame que consiste apenas em respirar calmamente para um bucal esterilizado durante 10 minutos, para colheita de líquido do condensado formado, no qual serão pesquisados marcadores inflamatórios que possam servir para avaliar a progressão da doença.

Porque fui escolhido para este estudo?

A população-alvo do presente estudo engloba todos os doentes com Sarcoidose que estejam a ser seguidos na consulta de Interstício Pulmonar do Serviço de Pneumologia A do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Por preencher estes critérios, foi selecionado para fazer parte do mesmo.

O que tenho de fazer?

Respirar calmamente para um bucal esterilizado durante 10 minutos

Que benefícios ou custos terei com este estudo?

A participação neste estudo é voluntária e não inclui nenhum tipo de pagamento ou custo para o participante.

Quem terá acesso aos meus dados?

Apenas os médicos da equipa de investigação terão acesso aos seus dados, garantindo o sigilo dos mesmos. A informação, depois de recolhida, será codificada para garantir total anonimato.

Se aceitar participar e mudar posteriormente de ideias, posso desistir?

Tal como referido, sendo um estudo de participação voluntária, pode em todos os momentos e sem qualquer prejuízo no seu atendimento normal desistir da participação. Ser-lhe-á apenas

solicitada uma justificação genérica do motivo de desistência para efeitos de validade científica.

Caso aceite o convite de participar neste estudo, queira por favor proceder à assinatura do consentimento informado que se anexa a este documento. A equipa aproveita também para lhe deixar um agradecimento pela participação, estando disponível para quaisquer esclarecimentos adicionais.

O Investigador,

Tiago Alfaro

Hospitais da Universidade de Coimbra – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Telefone 239 400 453

CONSENTIMENTO INFORMADO

1. Confirmando ter lido e compreendido a folha de informação relativa ao estudo acima referido. Tive oportunidade de colocar questões e todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e esclarecidas.

2. Entendo que a minha participação é voluntária e que, em qualquer altura, disponho de liberdade total para desistir do estudo, sem que seja necessário justificar-me e sem que os meus direitos médicos e legais sejam afetados.

3. É da minha vontade que participe neste estudo.

4. Entendo que os responsáveis por esta investigação terão acesso aos meus registos e poderão utilizá-los na realização do estudo referido. Por conseguinte, autorizo essas pessoas a utilizarem os dados constantes no meu historial clínico, tendo consciência que irão manter sigilo e de que a lei de dados aplicável será respeitada.

DATA: ____ / ____ / _____

Assinatura do doente:

Assinatura do médico recrutador:

Contactos da Equipa de Investigação:

- Investigador Tiago Alfaro
- Telefone: 239 400 453
- Local de trabalho: HUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra