



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Thaís Ferrari da Cruz

**Avaliação das pequenas vias aéreas em pacientes com doença pulmonar
obstrutiva crônica e deficiência de alfa-1 antitripsina**

Rio de Janeiro

2018

Thaís Ferrari da Cruz

Avaliação das pequenas vias aéreas em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e deficiência de alfa-1 antitripsina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cláudia Henrique Costa

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C957 Cruz, Thais Ferrari da.

Avaliação das pequenas vias aéreas em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e deficiência de alfa-1 antitripsina / Thais Ferrari da Cruz. – 2018.

73 f.

Orientadora: Claudia Henrique Costa

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Pulmões - Doenças - Teses. 2. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - Teses. 3. Enfisema Pulmonar - Teses. 4. alfa 1- Antitripsina. I. Costa, Claudia Henrique. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.24

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thaís Ferrari da Cruz

Avaliação das pequenas vias aéreas em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e deficiência de alfa-1 antitripsina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de novembro de 2018.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cláudia Henrique Costa

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogério Lopes Rufino Alves

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Agnaldo José Lopes

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Carlos Leonardo Pêsoa

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó, Therezinha por acreditar no estudo como ferramenta de crescimento pessoal e sempre me incentivar.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dra. Cláudia Henrique Costa por estar sempre presente, ter me incentivado e acreditado no potencial desse trabalho.

Ao meu marido Eduardo, e aos meus pais José Carlos e Marlene, por terem me apoiado de diversas formas durante todo esse processo.

Aos meus professores pneumologistas que contribuíram com essa pesquisa, em especial Prof. Dr. Rogério Rufino e Prof. Dr. Agnaldo Lopes.

Aos meus amigos de Residência Médica na Pneumologia que me ajudaram sempre que requisitei.

As secretárias, Débora Velloso e Valéria Knapp que me ajudaram nas várias etapas dessa pesquisa.

Aos pacientes, sem os quais a realização desse trabalho não seria possível

RESUMO

CRUZ, Thais Ferrari da. **Avaliação das pequenas vias aéreas em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e deficiência de alfa-1 antitripsina**. 2018. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

As pequenas vias aéreas, possuem diâmetro interno menor que 2 mm e não são avaliadas pelos testes de função pulmonar tradicionais. Dessa forma, o interesse pelo teste de washout de nitrogênio tem aumentado. Este trabalho teve por objetivo avaliar as pequenas vias aéreas em pacientes DPOC através de teste de washout de nitrogênio e verificar se existe diferença entre pacientes com DPOC tabágico e DPOC por deficiência de alfa-1 antitripsina. Foram selecionados do ambulatório de DPOC da UERJ 61 pacientes, desses 45 sem mutação do gene SERPINA1 e 16 com mutação, sendo 5 deles com mutações graves. Não se observou diferenças quanto os dados clínicos e funcionais (espirometria, volumes pulmonares e difusão) entre os dois grupos, exceto diferença na carga tabágica, menor no grupo com mutação. Foram comparadas as variáveis ΔN_2 750-1250ml (%), Slope de fase III (%) e Capacidade de fechamento (%) do teste de washout de nitrogênio nesses dois grupos com mutação (n=16) e sem mutação(n=45). O slope de phase III e o ΔN_2 750-1250mL (%) foram capazes de predizer níveis de gravidade de DPOC como VEF1(%). E relacionando a carga tabágica com a Capacidade de fechamento (%), verificamos relação inversa no grupo de pacientes com DPOC e mutação do gene alfa 1 antitripsina (p=0,014). As pequenas vias aéreas possuem grande importância na gênese e desenvolvimento das doenças pulmonares em geral, especialmente da DPOC. Esse foi o primeiro estudo a avaliar as pequenas vias aéreas através do teste de washout de nitrogênio em pacientes com mutação do gene SERPINA 1. Foi possível observar diferença na heterogeneidade da ventilação, pelo teste de washout, nos pacientes DPOC apenas pelo tabagismo com DPOC e deficiência de alfa-1 antitripsina.

Palavras chaves: DPOC. Serpina 1. Deficiência de alfa1 antitripsina. Enfisema. Lavagem de nitrogênio.

ABSTRACT

CRUZ, Thais Ferrari da. **Evaluation of the small airways in patients with chronic obstructive pulmonary disease and alpha-1 antitrypsin deficiency.** 2018. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The small airways have an internal diameter of less than 2 mm and are not evaluated by traditional pulmonary function tests. Thus, interest in the nitrogen washout test has increased. This study aimed to evaluate the small airways in COPD patients through a nitrogen washout test and to verify if there is a difference between patients with smoking COPD and COPD due to alpha-1 antitrypsin deficiency. It was contacted by telephone 582 patients from the COPD outclinic, and 61 were included in the study, 45 of whom had no mutation of the Serpina 1 gene and 16 with mutation, 5 of them with severe mutations. There were no differences in clinical and functional data (spirometry, pulmonary volumes, diffusion capacity) between the two groups, except for differences in smoking load, which was smaller in patients with mutation. The variables $N\Delta 2$ 750-1250ml (%), Slope of phase III (%) and Closing capacity (%) of the nitrogen washout test were compared in these two groups with mutation (n = 16) and without mutation (n = 45). The phase III slope and the $\Delta N2$ 750-1250mL (%) were able to predict levels of COPD severity as FEV1 (%). In addition, we found an inverse relationship between the smoking load and closing capacity (%) in the group of patients with COPD and mutation of the alpha 1 antitrypsin gene ($p = 0.014$). The small airways are of great importance in the genesis and development of lung diseases in general, especially COPD. This was the first study to evaluate the small airways through the nitrogen washout test in patients with mutation of the gene SERPINA 1. It was possible to observe a difference in ventilation heterogeneity by the washout test in COPD patients only due to smoking with COPD and alpha-1 antitrypsin deficiency.

Keywords: COPD. Alpha1 antitrypsin deficiency. Emphysema. Nitrogen washout. Serpina 1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fluxograma de recrutamento.....	32
Gráfico 1 –	Relação entre a carga tabágica medida em maços/ano com Slope de fase III (%) comparação entre grupos DPOC com mutação grave do gene SERPINA 1 e DPOC por tabagismo.....	36
Gráfico 2 –	Associação entre a carga tabágica com Capacidade de Fechamento (%) em pacientes com mutação do gene SERPINA1 e DPOC por tabagismo Carga tabágica (maços-ano).....	38
Gráfico 3 –	Médias da ΔN_2 750-1250ml (%) em pacientes com DPOC estratificados de acordo com a gravidade.....	41
Gráfico 4 –	Médias do Slope de fase III em em pacientes com DPOC estratificados de acordo com a gravidade.....	41
Figura 2 –	Quantidade de nitrogênio exalado nos diferentes estágios do teste de washout de nitrogênio.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados demográficos dos pacientes analisados.....	33
Tabela 2 –	Dados demográficos dos pacientes DPOC classificados conforme GOLD 2006.....	34
Tabela 3 –	Dados demográficos dos pacientes DPOC classificados conforme GOLD 2011.....	35
Tabela 4 –	Dados demográficos dos pacientes DPOC classificados a partir da presença de sintomatologia de acordo com a escala MRC	36
Tabela 5 -	Dados demográficos dos pacientes DPOC classificados de acordo com numero de exacerbações no último ano	37
Tabela 6 –	Valores espirométricos dos pacientes analisados.....	38
Tabela 7 –	Níveis sanguíneos do Fator de von Willebrand absoluto distribuídos por grupo de pacientes.....	39
Tabela 8 -	Níveis sanguíneos do Fator de von Willebrand percentual distribuídos por grupo de pacientes.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Alfa-1-antitripsina
ALT	Alanina aminotransferase
ANCA-C	Anticorco anticitoplasma de neutrófilo
AST	Aspartato aminotransferase
ATS	American Thoracic Society
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CF	Capacidade de Fechamento
CPT	Capacidade pulmonar total
CV	Capacidade vital
CVF	Capacidade vital forçada
DAAT	Deficiência de Alfa-1 Antitripsina
DLCO	Difusão do monóxido de carbono
DP	Desvio padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ERS	European Respiratory Society
FDA	Food and Drugs Administration
FEFmax	Fluxo expiratório forçado máximo
FEF50%	Fluxo expiratório forçado em 50% de volume da CVF
FEF25-75%	Fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF
FIF50%	Fluxo expiratório forçado em 50% de volume da CVF
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstrutive Lung Disease
Hb	Hemoglobina
HRQoL	Health-Related Quality of Life
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IgA	Imunoglobulina A
KCO	Constante de Krogh
IBM	International Business Machines
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6

IMC	Índice de massa corporal
IT	Índice de Tiffeneau
mMRC	Modifed Medical Research Concil – escala de dispneia
M/A	Maços/Ano
N2	Nitrogênio
NHLBI	National Heart Lung and Blood Institute
NY	New York
O2	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Probabilidade de significância
PCR	Proteína C Reativa
PEF25%	Curvas de Volume de fluxo a 25%
PGCM	Pós-Graduação em Ciências Médicas
Pi	Protease inibidor
PPC	Policlínica Piquet Carneiro
SERPINA	Serin protease inibidor
SPSS	Statistical Package for the Social Science
TAP	Tempo de ativação da protrombina
TET	Tempo expiratório total
TC	Tomografia computadorizada
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TTPa	Tempo de ativação parcial da tromboplastina
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VA	Volume Alveolar
VEF1	Volume respiratório forçado no primeiro segundo
VF	Volume de Fechamento
VR	Volume residual
VVM	Ventilação Voluntária Máxima
Δ N2-750-1250	Variação do Nitrogênio entre 750 e 1250 ml

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	HIPÓTESE	24
2	OBJETIVO GERAL	25
2.1	Objetivos específicos	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	Desenho do estudo	26
3.2	Cálculo amostral	26
3.3	Análise estatística	26
3.4	Critérios de inclusão	27
3.5	Critérios de exclusão	27
3.6	Procedimentos	27
4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Seleção dos pacientes	31
5.2	Avaliação clínica e funcional	32
5.3	Estudo de washout de nitrogênio	35
5.4	Relação com carga tabágica – capacidade de fechamento(%) sem outlier	36
5.5	Comparação de pacientes com DPOC, mutação do gene SERPINA1 e carga tabágica até 10 m/a com pacientes DPOC exclusivamente tabágicos e carga tabágica > 10 m/a	38
5.6	Classificação da gravidade do DPOC	40
6	DISCUSSÃO	42
6.1	Avaliação dos dados clínicos e funcionais	42
6.2	Classificação da gravidade de DPOC	47
6.3	Proposta de aplicabilidade do teste de washout na DPOC e mutação do gene SERPINA-1/deficiência de alfa-1 antitripsina	48
6.4	Limitações do estudo	49
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS	51

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido para pesquisa.....	55
APÊNDICE B – Artigo submetido.....	58
ANEXO A – Parecer consubstanciado do cep.....	71
ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo.....	73

INTRODUÇÃO

Impacto da DPOC

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença com alta morbidade e mortalidade e que leva a piora importante da qualidade de vida dos indivíduos acometidos, por isso é um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo (LOPES et al, 2017). Apesar da DPOC ser uma doença primariamente dos pulmões também causa efeitos sistêmicos que levam à um declínio no status de saúde (DEUS et al, 2018). É uma doença heterogênea causada tanto por alterações genéticas quanto por exposição a gases nocivos (BOECK et al, 2016). Torna-se um problema ainda mais grave quando apresenta início precoce, como ocorre nos portadores de deficiência de alfa-1 antitripsina (BOECK et al, 2016). Nos Estados Unidos estima-se que 2% dos pacientes com DPOC tenham a deficiência (WEWERS et al, 1987).

Características Moleculares

A alfa-1-antitripsina é uma glicoproteína produzida principalmente nos hepatócitos, é o principal inibidor de protease do soro, e é a principal substância responsável pela inibição da elastase neutrofílica (CAMELIER et al, 2008). Essa enzima é produzida por neutrófilos em resposta a algum estímulo inflamatório e tem como objetivo destruir agentes agressores. Mas como é uma das poucas enzimas humanas capazes de degradar fibras elásticas, pode levar à destruição de tecidos, especialmente das paredes alveolares (SERRA et al, 2008; VECCHIOLA et al, 2008). A importância da AAT consiste, portanto, no fato de que ela age como antagonista dessa enzima levando a proteção da integridade dos tecidos (SERRA et al, 2008; STOCKS et al, 2010)

A perda da atividade anti inflamatória e anti proteolítica associada aos efeito pró-inflamatórios dos polímeros contribuem para a degradação proteica e a exacerbação da inflamação, resultando em risco aumentado de desenvolvimento de DPOC, com predomínio de enfisema, principalmente em fumantes (GODOY, 2016).

Apesar de a elastase neutrofílica ser o principal substrato da alfa-1-antitripsina, ela também neutraliza de maneira eficaz a proteinase-3, mieloperoxidasas, catepsinas G, alfa-defensinas do neutrófilo, quimase e triptase do mastócito, tripsina das células epiteliais e do pâncreas, quimiotripsina pancreática, granzima dos linfócitos, calicreínas 7 e 14; e as serina proteases circulantes, plasmina, trombina e uroquinase e fator X ativado (MENGA et al, 2014). Sendo assim é responsável por 90% de toda atividade anti-protease do soro humano; os 10% restantes são realizados pela α 2-macroglobulina (MENGA et al, 2014).

O organismo produz ao redor de 34 mg/dia/Kg de peso de alfa-1-antitripsina, a concentração plasmática é alta ficando ao redor de 1-2g/L. Sendo que 80% se difunde no interstício, 0,5-1% alcança os fluidos biológicos como saliva, lágrimas, leite, sêmen, urina, líquido cefalorraquidiano, bile e está presente no líquido alveolar em uma concentração de 0,1-0,3g/L. A AAT é considerada uma proteína de fase aguda podendo se encontrar elevada em situações como inflamação aguda ou crônica, infecções, algumas neoplasias, queimaduras graves, gravidez e uso de anticoncepcionais (VIDAL et al, 2006). Existe ainda uma associação entre a menopausa e a AAT na mulher, sugerindo que hormônios femininos podem influir nos níveis circulantes (VIDAL et al, 2006; RODRÍGUEZ et al, 2011).

Características genéticas

A deficiência de AAT ocorre devido a uma alteração genética autossômica codominante, resultante de mutações no gene SERPINA1 (serin protease inibidor), locus Pi, localizado no braço longo distal do cromossomo 14 (posição q31-32,3), e é ativado por produtos gerados durante a inflamação, como lipossacarídeos, interferon B, citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α (HUBRARD, 1988; FARIA et al, 2005) . A transmissão é através de herança mendeliana simples; ou seja cada alelo recebido de cada progenitor se expressa independentemente a 50% (CAMELIER et al, 2008).

Existem mais de 100 variantes genéticas, mas a maioria das variantes não possui significância clínica. A mais comum é a M, que está presente em 95% da população caucasiana e é considerada normal (HUTSEBAUT et al, 2015). Há 50 anos os primeiros pesquisadores observaram a velocidade dessas proteínas na eletroforese e as denominaram conforme sua velocidade de migração eletroforética, por exemplo M, de velocidade média, S de slow, F de fast e a Z foi nomeada assim por ter migração muito lenta, correspondendo à

última letra do alfabeto (COSTA; SANTOS, 2009). Após a introdução do isoeletroenfoque (gradiente de pH isoelétrico) foi possível identificar novas variantes e assim foram nomeados de A-L as proteínas de migração rápida e de N-Z as de migração lenta. Então veio o PCR e descobriu-se um número ainda maior de mutações, quando todas as 28 letras do alfabeto foram usadas passou-se a acrescentar números às variantes associadas a um mesmo fenótipo (por exemplo M1, M2, M3), já as variantes nulas (Null) e as raras são denominadas por um sufixo seguido do nome da cidade onde o primeiro portador foi identificado (ex. Mpalermo, Ybarcelona e etc.) (MENGA et al, 2014).

De acordo com os níveis séricos de alfa-1-antitripsina e função molecular, as variantes são classificadas em 4 grupos: a) Variantes normais: (nível sérico e função normal) alelos M; b) Variantes deficientes: (nível sérico reduzido) alelos S, variantes raras, além do alelo Z, que é o mais frequentemente associado à doença; c) Variante nula: (quando o nível sérico de alfa-1 é indetectável) alelos Q0; d) Variantes disfuncionais: (nível sérico normal com função reduzida) alelos F e Pittsburg (entre outros) (COSTA; SANTOS, 2009). Os fenótipos ZZ, SZ, Null (homozigótico) e algumas mutações raras são de alto risco para desenvolvimento de enfisema. Os indivíduos SS, MZ, MS possuem baixo risco para patologias e geralmente não têm indicação de tratamento de reposição, embora o tabagismo sempre deva ser evitado (COSTA; SANTOS, 2009).

As mutações S, Z e mutações raras acarretam graves alterações na conformação da proteína de alfa-1-antitripsina. No caso do alelo mutado Z, ocorre a substituição do ácido glutâmico por lisina na posição 342 do gene SERPINA 1 e essa alteração acontece justamente no ponto de conformação da proteína que codifica o seu sítio ativo comprometendo a sua funcionalidade (CAMELIER et al, 2008). Na mutação S a alteração ocorre no tronco da proteína sem alterar o seu sítio ativo, o que não interfere na sua capacidade inibitória. Além disso, proteínas instáveis dentro das células podem se agregar formando dímeros e polímeros estáveis que são tóxicos dentro do ambiente celular. No caso da mutação S existe uma tendência muito menor à polimerização em relação à mutação Z (MENGA et al, 2014).

Prevalência

A deficiência de AAT já foi considerada uma doença rara; entretanto, segundo dados epidemiológicos atuais, pode ter incidência semelhante ou superior à da fibrose cística,

dependo da região avaliada (afetando um em cada 2000-5000 indivíduos), sendo uma doença subdiagnosticada (CAMELIER et al, 2008). Em países desenvolvidos foram estimados que apenas 0,41% e 0,35% dos indivíduos com genótipo alterado tenham sido reconhecidos (LARA, 2010).

A frequência das mutações varia com a população estudada. Na Europa a prevalência do alelo deficiente Z segue um gradiente descendente de Norte-Sul e Leste-Oeste, sendo os países escandinavos os que apresentam a maior prevalência dessa mutação (LARA, 2010). Provavelmente foi uma mutação que ocorreu há 2000 anos na população Viking (GAUVAIN et al, 2015). Sabe-se que o genótipo ZZ está praticamente ausente na Ásia e na África; no caso do alelo S a maior prevalência se encontra na Península Ibérica (LARA; MILRALVITLLES, 2015). Estima-se que o México, América Central, Ilhas do Caribe e América do Sul tenham uma incidência baixa de mutações (CAMELIER et al, 2008).

Recentemente no Brasil foi publicado um artigo que estudou a prevalência da deficiência da alfa-1 antitripsina assim como a frequência de alelos mutados em pacientes com DPOC no país. Esse estudo incluiu 926 pacientes de 5 estados diferentes e demonstrou que a prevalência da mutação do gene SERPINA1 entre pacientes com DPOC é semelhante à de outros países como os Estados Unidos e chega a 2,8%. A prevalência do genótipo ZZ na população brasileira por esse estudo é de 0,8% (RUSSO et al, 2016).

Manifestações Clínicas

Devemos suspeitar da DATT (deficiência de alfa-1 antitripsina) em pacientes com enfisema de início precoce (<45anos), enfisema na ausência de fatores de risco identificáveis, enfisema de predomínio basal, doença hepática não esclarecida, bronquiectasias de etiologia desconhecidas, asma cuja espirometria não normaliza apesar do tratamento otimizado, história familiar de enfisema e doença hepática, deficiência de alfa-1 antitripsina confirmada na família, ausência de banda alfa-1 confirmada por eletroforese, vasculite ANCA-c positiva e paniculite necrozante (CAMELIER et al, 2008; CASAS et al, 2015; COSTA; SANTOS, 2009).

Em geral, um típico paciente com deficiência grave de AAT inicia com sintomas entre 25 e 40 anos, apresenta dispneia ao exercício e progride com limitação de suas atividades de

vida diária, desenvolvendo um quadro de pulmão terminal em torno dos 60 anos (LUISETTI et al, 2015).

O enfisema na deficiência da AAT é do tipo panlobular de predomínio basal, surgindo em 75-85% dos indivíduos com déficit grave. Há estudos que demonstram bronquiectasia em 45% dos pacientes na mesma localização do enfisema (COSTA; SANTOS, 2009). Existem recomendações para que pacientes com déficit de AAT evitem o consumo de álcool, com a finalidade de reduzir a possibilidade de dano hepático, e que nunca fumem (STRANGE et al, 2015). A exposição desses pacientes ao tabaco é um fator importante para deflagrar a doença (MOLLOY et al, 2014; PITULAINEN et al, 2015). Assim, uma menor exposição ao cigarro se relaciona a uma progressão mais lenta do enfisema no paciente DPOC deficiente de AAT (O'BRIEN et al, 2015). Além disso, esses indivíduos podem ser mais vulneráveis aos carcinógenos contidos no tabaco sendo pacientes portadores de 1 ou 2 alelos deficientes considerados de alto risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão (RODRÍGUEZ et al, 2011).

Para facilitar o reconhecimento dos indivíduos com deficiência de alfa-1-antitripsina existe uma recomendação da OMS e das sociedades ATS/ERS para que a ATT seja dosada ao menos uma vez em todos os pacientes diagnosticados com DPOC (AMERICAN THORACIC SOCIETY; EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY, 2003). Existem recomendações também para se realizar screening: em familiares de casos índices, em todos os pacientes com asma que não apresentam reversão total da obstrução ao fluxo aéreo mesmo em tratamento otimizado, em todos os recém-natos com transtorno da anticoagulação e uma icterícia neonatal prolongada, e na investigação dos indivíduos cirróticos (BRADI et al, 2015; CAMELIER et al, 2008; COSTA; SANTOS, 2009; VIDAL et al, 2006)

Diagnóstico

O diagnóstico é firmado quando níveis séricos reduzidos são encontrados concomitantes a um fenótipo sabidamente relacionado à doença (COSTA; SANTOS, 2009). Os níveis plasmáticos normais da alfa-1 antitripsina medidos pelo método de imunonefelometria estão entre 150-350mg/dL, sendo que para proteção pulmonar são necessários pelo menos 50-80mg/Dl (BARKER et al, 1997; HUTSEBAUT et al, 2015). Uma vez diagnosticados, esses pacientes têm prognósticos variáveis quanto às doenças hepática e pulmonar (RODRÍGUEZ et al, 2011).

Testes de Função Pulmonar

As alterações espirométricas consequentes ao enfisema por deficiência de AAT são as mesmas descritas na DPOC: obstrução ao fluxo aéreo, representada por redução da relação volume expiratório forçado no primeiro segundo/capacidade vital forçada (VEF1/CVF) e do VEF1 (volume expiratório forçado no primeiro segundo), enquanto a CVF (Capacidade Vital Forçada) se encontra geralmente normal (CAMELIER et al, 2008). Tem sido demonstrado que o VEF1 é o melhor preditor de sobrevivência para os pacientes com enfisema pulmonar (RODRÍGUEZ et al, 2011). Apesar da espirometria ser a ferramenta atualmente utilizada para o diagnóstico de DPOC demonstrando limitação do fluxo aéreo, a variável FEF25-75% possui uma menor sensibilidade para indicar acometimento das vias aéreas periféricas do que o variável Slope de fase III do teste de washout de nitrogênio (USEMANN et al, 2017; LOPES, 2015).

A determinação completa dos volumes pulmonares também constitui-se em uma das etapas de avaliação funcional pulmonar, seguindo-se usualmente à espirometria (BARRETO et al, 2002). Os volumes pulmonares nas doenças obstrutivas estão aumentados de forma desproporcionada; tanto o volume residual (VR) como a CPT (Capacidade Pulmonar Total) tende a aumentar. Por isso, se em distúrbios obstrutivos a espirometria demonstrar CVF dentro da faixa da normalidade, a medida da CPT se torna desnecessária; entretanto se a CVF estiver reduzida, a medida da CPT faz a determinação do distúrbio como misto ou obstrutivo isolado. A relação VR/CPT aumentada demonstra uma quebra de proporcionalidade entre as variáveis VR e CPT; mas por ser pouco específica não deve ser interpretada isoladamente (BARRETO et al, 2002).

A capacidade de difusão dos pulmões para o monóxido de carbono (DLCO) examina uma segunda etapa; a transferência dos gases dos alvéolos até o interior das hemácias. Na presença de obstrução, uma medida de difusão alterada sugere o diagnóstico de enfisema, esse teste habitualmente se encontra normal nos pacientes com asma e naqueles com DPOC com predominância do padrão clínico de bronquite crônica (BARRETO et al, 2002). No enfisema, o comprometimento da capacidade de difusão se correlaciona com a gravidade da obstrução das vias aéreas, a capacidade de exercício e com a densidade pulmonar na tomografia computadorizada de tórax. Essa correlação provavelmente reflete a perda da área de superfície de troca e da perda do leito capilar pulmonar. Esse teste pode ser útil também naqueles pacientes com dispneia significativa e alterações obstrutivas discretas (AZEVEDO, 2013) [2].

A variável KCO é usada por Hughes como equivalente à DLCO/VA (difusão dos pulmões para o monóxido de carbono por unidade de volume alveolar). Consideramos o KCO como um índice da eficiência da transferência alveolar de monóxido de carbono (aproximadamente a taxa de captação de CO); “Transferência” é um termo melhor que “difusão” devido à importância da taxa de reação de monóxido de carbono com sangue capilar pulmonar (HUGHES; PRIDE, 2012).

Pequenas vias aéreas

As pequenas vias aéreas se caracterizam por possuírem um diâmetro interno de sua luz menor do que 2mm e pela ausência de cartilagem em suas paredes. Nessa região ocorre a maior parte da obstrução relacionada à DPOC (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016; MCDONOUGH et al, 2011). Esta região contribui com apenas 10% da resistência das vias aéreas. Por isso, quando ocorre obstrução local a resistência aumenta pouco e repercute pouco nos mecanismos respiratórios. Entretanto, ocorre grande repercussão na distribuição da ventilação e essa repercussão não consegue ser avaliada através dos testes de função tradicionais como espirometria, pletismografia e difusão (BOECK et al, 2016). A manobra de respiração única no teste de washout de nitrogênio tem sido a mais utilizada pela facilidade de realização (em menor tempo) em relação à manobra de respiração múltipla (MIKAMO et al, 2013).

Tomografia de Tórax

Durante os últimos anos, o interesse nas imagens das pequenas vias aéreas aumentou, mas os bronquíolos com diâmetros menores de 2 mm não são vistos na tomografia computadorizada (TC). Mesmo as tomografias mais modernas de alta resolução não conseguem visualizar essas pequenas vias aéreas devido à finura de suas paredes. Entretanto a TC de alta resolução tem permitido uma visualização indireta dessa região pulmonar. A atenuação em mosaico e o aprisionamento aéreo têm sido considerados marcadores de doença das pequenas vias aéreas, principalmente na asma e DPOC. Além disso, a presença de

pequenos nódulos centrolobulares e ramificações lineares podem demonstrar também alterações das pequenas vias aéreas, que podem ser reversíveis ou definitivas (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016).

Existem muitas limitações, ainda, ao uso da TC para avaliação das pequenas vias aéreas como a exposição à radiação, que pode trazer consequências e levar à malignidade, principalmente em mulheres jovens; e também a falta de padronização para avaliação da atenuação pulmonar e aprisionamento aéreo. Além disso, a redução da atenuação pulmonar pode estar relacionada a uma diminuição da ventilação mas poderia também ocorrer por redução da perfusão pulmonar; assim, ainda hoje, existem dificuldades em se diferenciar anormalidades vasculares e de vias aéreas pela imagem (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016).

Teste de Washout de Nitrogênio

O teste de washout de nitrogênio tem o intuito de medir a função das pequenas vias aéreas e a homogeneidade de distribuição da ventilação em diversas condições clínicas. Na técnica do washout de nitrogênio em respiração única o paciente inicia expirando todo ar até volume residual, em seguida inala lentamente oxigênio a 100% até sua capacidade total. Então o paciente segue realizando uma expiração completa e nesse momento o aparelho grava uma curva vertical quantificando o nitrogênio exalado, é possível ver na curva o aumento da concentração de nitrogênio (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016). Assim, são identificadas quatro fases registradas durante a manobra: • Fase I (espaço morto anatômico): Corresponde ao gás das vias aéreas superiores com 100% de O₂ ; • Fase II (fase brônquica): Ocorre uma elevação abrupta na concentração de N₂ com mistura de ar alveolar e brônquico; • Fase III (fase alveolar): Há um plateau do gás alveolar no qual as concentrações de O₂ e N₂ mudam lentamente e uniformemente – esta fase consiste inteiramente de gás alveolar; • Fase IV: Há uma elevação abrupta na concentração de N₂ conforme as vias aéreas da base pulmonar se fecham e uma maior proporção de N₂ dos ápices pulmonares é exalada (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016).

Os principais parâmetros derivados da TWN₂ (teste de washout de nitrogênio em respiração única) são os seguintes: 1- ΔN_2 -750-1250mL: É a diferença na concentração do N₂ entre 750 mL e 1250 mL do gás expirado (o volume expirado inicial de até 750 mL

contém gás de espaço morto das fases I e II e, por isso, não é utilizado para avaliar a distribuição da ventilação). Seu valor normal é $\leq 1,5\%$ em adultos saudáveis, sendo ligeiramente maior em idosos onde pode chegar a 3%. Em pacientes com enfisema extenso, o ΔN_2 -750-1250mL pode exceder mais de 10%. 2- Slope da fase III: é a alteração na concentração de N_2 entre 25% e 75% do volume expirado. É relatada como $\% \Delta N_2$ por litro de volume pulmonar, sendo que os valores normais variam entre 0,5% e 1,5% e valores elevados são indicativos de heterogeneidade na ventilação. Ao final da curva a concentração se acentua e é nesse ponto que é possível identificar o volume de fechamento considerado a fase IV do washout. Durante essa fase ocorre o completo fechamento das pequenas vias aéreas das regiões basais dos pulmões e a continuação da expiração termina com o fechamento das vias aéreas superiores que possuem uma alta concentração de nitrogênio. O fechamento precoce das pequenas vias aéreas das regiões superiores dos pulmões indica aprisionamento aéreo. 3- O volume de fechamento representa a porção da capacidade vital que é expirada após o início do fechamento das vias aéreas, seu valor normal é $< 20\%$ e representa o final da fase IV até o VR (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016). E a capacidade de fechamento que é uma variável derivada do volume de fechamento, sendo igual ao volume de fechamento somado ao volume residual (LOPES, 2015).

O teste de washout em técnica de respiração única ainda não possui um papel muito claro na avaliação das pequenas vias aéreas; não se sabe se avalia apenas as pequenas vias aéreas ou as pequenas vias aéreas associadas às vias aéreas de maior calibre (BOECK et al, 2016). Mesmo assim, tem sido utilizado no diagnóstico precoce, na estratificação de pacientes e na avaliação e gravidade das doenças pulmonares (LOPES, 2015).

Tratamento dos pacientes com enfisema

O enfisema nos pacientes com déficit de alfa-1-antitripsina geralmente é tratado da mesma forma que nos pacientes DPOC por outras etiologias; consistindo no uso de broncodilatadores, corticoides inalatórios (quando indicados), tratamento de exacerbações, reabilitação e vacinação (CAMELIER et al, 2008). O que muda, no entanto, seria a decisão por iniciar tratamento de reposição com a alfa-1-antitripsina endovenosa nos casos que necessitem melhora da proteção contra agentes inflamatórios ou seja, naqueles indivíduos com níveis séricos muito baixos da glicoproteína (CAMELIER et al, 2008). Nas agudizações,

deve-se atentar para o fato de que em pacientes com deficiência de AAT a atividade da elastase está aumentada, portanto o tratamento nesses pacientes deve ser agressivo e prontamente realizado (CHOROSTOWSKA-WYNIMKO et al, 2015; VIDAL et al, 2006).

A relação custo-benefício do tratamento endovenoso com AAT deve ser considerada, já que o custo é elevado. Entretanto, a reposição endovenosa da alfa-1 ainda é o único tratamento disponível para esses pacientes (CAMELIER et al, 2008). A terapia parece ter resultados positivos, mas são mais expressivos em determinados grupos de pacientes, como os com doença pulmonar clinicamente estabelecida e progressiva; e naqueles pacientes com obstrução moderada ao fluxo aéreo (VEF1% entre 80-50% do previsto) (CAMELIER et al, 2008; CHAPAMAN et al, 2009).

Como a AAT é uma proteína que possui meia vida plasmática de 4-5 dias as posologias inicialmente estudadas indicavam reposições semanais (VIDAL et al, 2006). A posologia terapêutica vigente e aprovada pela agência americana de regulação, Food and Drug Administration (FDA) (60mg/kg) parece ser eficaz, mas são necessárias infusões semanais com duração de 4hs. Ainda que não aprovadas pela FDA, posologias com doses maiores e infusões mais espaçadas: a cada 14 e 21 dias, parecem ter eficácia semelhante. Enquanto infusões a cada 28 dias ou mais, são menos viáveis devido à necessidade de doses muito elevadas da medicação em cada infusão (CAMELIER et al, 2008).

A reposição tem-se mostrado bem tolerada e os efeitos colaterais como cefaleia, tontura, náuseas e dispneia são em sua maioria leves a moderados (CAMELIER et al, 2008). Nos registros do NHLBI (National Heart Lung and Blood Institute), a maior base de dados sobre os efeitos adversos da reposição de AAT, identificou-se 0,02 reações adversas por paciente/mês; sendo que somente 9% foram consideradas graves e dessas, apenas 1,7% resultaram em necessidade de atendimento de emergência (VIDAL et al, 2006). A terapêutica possui também poucas contraindicações, sendo as principais indivíduos tabagistas e aqueles que apresentem déficit de IgA, este pelo risco de anafilaxia quando da infusão de antiprotease humana, que poderá conter vestígios de imunoglobulina A. O tratamento não tem indicação na doença hepática ou cutânea, já que estas manifestações ocorrem pelo acúmulo de polímeros e não pela deficiência da glicoproteína (COSTA; SANTOS, 2009).

Estudos mostram maior estabilidade clínica e radiológica e menor declínio anual do VEF1 após o início do tratamento de reposição com AAT (COSTA; SANTOS, 2009; LARA; MILRAVTLLES, 2015). O tratamento parece retardar a progressão do enfisema, reduzir a frequência das exacerbações e ainda levar a uma melhora na qualidade de vida (avaliado

através do HRQoL) (TESCHLER, 2015). Mas há déficit de estudos randomizados controlados para realmente comprovar sua eficácia (CHAPMAN et al, 2009).

Utilização do Washout na DAAT

Dados da espirometria convencional só se alteraram em pacientes com deficiência de AAT por volta dos 40 anos, enquanto testes de difusão e a tomografia computadorizada (TC) de tórax podem demonstrar anormalidades por volta da segunda década de vida. Sendo assim, a investigação de pacientes utilizando teste de difusão e TC além da espirometria tradicional possibilita o reconhecimento de pacientes mais precocemente (STOCKLEY, 2015). Como as pequenas vias aéreas representam o principal local de limitação do fluxo aéreo em indivíduos com DPOC, o teste de washout de nitrogênio pode nos levar a entender melhor a fisiopatologia da doença (LOPES; MAFORT, 2014).

1 HIPÓTESE

Os pacientes com DPOC devido à deficiência da AAT apresentam mais alterações nos testes de função pulmonar, especialmente nas pequenas vias aéreas do que os pacientes com doença obstrutiva derivada exclusivamente do tabagismo.

2 OBJETIVO GERAL

Comparar dados clínicos e funcionais de pacientes com DPOC causada pela deficiência de alfa-1-antitripsina com pacientes com DPOC devido exclusivamente ao tabagismo.

2.1 Objetivos específicos

- a) Verificar, através de teste de *washout* de nitrogênio, se é possível identificar doença nas vias aéreas de pequeno calibre em pacientes com DPOC por mutação do gene SERPINA 1;
- b) Comparar dados da função pulmonar de pacientes com mutação do gene SERPINA 1 com pacientes com DPOC devido exclusivamente ao tabagismo.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Estudo transversal, descritivo e não intervencionista que incluirá pacientes com diagnóstico de DPOC com e sem mutação do gene SERPINA 1.

3.2 Cálculo amostral

Como no momento do delineamento do estudo não haviam dados sobre número de pacientes com deficiência de AAT na população brasileira, nem encontramos nenhum trabalho que estudasse as pequenas vias aéreas nesses pacientes, não foi possível realizar cálculo amostral. No entanto, verificamos que existe publicação que compara os resultados do *washout* de nitrogênio com o teste da caminhada de 6 minutos e que apresentou resultado estatisticamente significativo analisando 26 pacientes (LOPES, MAFORT, 2014). Assim, incluímos 15 pacientes com DPOC e mutação do gene SERPINA 1 e 46 pacientes com DPOC tabágico.

3.3 Análise estatística

Para descrição de variáveis quantitativas foram consideradas as estatísticas de média, mediana, valor mínimo, valor máximo, primeiro e terceiro quartis e desvio padrão. A sumarização das variáveis qualitativas foi efetuada considerando-se frequências e percentuais. Para comparação dos grupos, em relação às variáveis quantitativas, foram considerados os testes t de Student para amostras independentes e não paramétrico de Mann-Whitney. Para comparação das classificações de DPOC, em relação às variáveis de *washout* de nitrogênio, foi considerado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparação dos grupos em relação às variáveis de *washout* de nitrogênio, foi ajustado o modelo de análise de

covariância, considerando-se a carga tabágica, ou seja, o número de maços/ano como covariável. Para avaliação da homogeneidade dos grupos em relação a variáveis qualitativas foi usado o teste Qui-Quadrado. A condição de normalidade das variáveis foi analisada pelo teste Jarque-Béra. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

3.4 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão utilizados foram: pacientes maiores de 18 anos, acompanhados no ambulatório de pneumologia, com diagnóstico de DPOC de acordo com os critérios do documento GOLD de 2017 (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*), apresentando características clínicas compatíveis e espirometria com relação VEF_1/CVF pós-broncodilatador < 0.7 [19]. Os pacientes deveriam ter carga tabágica ≥ 10 maços-ano e/ou mutação do gene SERPINA1 como causa da DPOC.

3.5 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: ter diagnóstico de doenças pulmonares por outras causas (por ex. fibrose pulmonar, sequela de tuberculose), exacerbação da doença pulmonar nos últimos 3 meses, doenças infecciosas de qualquer natureza nos últimos 3 meses, história de asma brônquica, rinite ou alergia respiratória, pacientes previamente submetidos a cirurgia torácica, gestantes, pacientes previamente transplantados ou apresentar histórico de incapacidade de realizar testes de função respiratória.

3.6 Procedimentos

Os pacientes foram inicialmente contatados por telefone e agendados para uma avaliação presencial para verificação dos critérios de seleção e realização dos procedimentos do estudo.

Foram coletados dados como idade, sexo, índice de massa corpórea, história ocupacional, história tabágica e uso de oxigênio domiciliar. Todos os testes de função pulmonar foram realizados mesmo que o paciente tivesse um exame espirométrico recente de forma a garantir a realização dos testes por uma mesma pessoa e no mesmo aparelho. A espirometria e as medidas de volumes e da capacidade de difusão foram realizadas no equipamento HD CPL (nSpire Health Inc., Longmont, CO, EUA) e seguiram a padronização e interpretação da American Thoracic Society, 2005 (MILLER et al, 2005). Foram adotadas as equações de Knudson (KNUDSON et al, 1983) e Neder (NEDER et al, 1999). O teste de washout de Nitrogênio foi realizado no aparelho HD PFR 3000 (nSpireHealth, Inc., Longmont, CO, EUA) a manobra de respiração única foi realizado de acordo com as recomendações da American Thoracic Society/ European Respiratory Society (ROBINSON et al, 2013). Para a padronização dos valores de Slope de fase III e Capacidade de Fechamento quanto aos dados antropométricos dos pacientes foram usadas as equações de Teculescu (TECULESCU et al, 2004).

Foram realizados também em todos os pacientes a Dosagem de alfa-1-antitripsina por imunonefelometria em papel filtro, com coleta de sangue por gotejamento obtido por uma picadura na região distal de um dos dedos da mão, sobre um papel-filtro. Nos pacientes com níveis baixos; menores que 2,64 mg/dL, corte informado pelo laboratório, a presença de mutação foi confirmada por estudo molecular do gene SERPINA1 ou por sequenciamento genético, conforme a necessidade, no laboratório Medicina Laboratorial Afip. Este procedimento tem sido realizado como rotina no ambulatório de DPOC em todos os pacientes e foi realizado especificamente para o estudo quando o paciente não tinha o diagnóstico reportado no prontuário.

A classificação quanto à gravidade da limitação do fluxo aéreo na DPOC foi baseada nos critérios apresentados no documento GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) 2017. Utilizando-se o valor de VEF1(volume expiratório forçado no 1o segundo) pós broncodilatador da espirometria, classificamos em Leve quando $VEF1 > 80\%$; moderado quando $VEF1 < 80\%$ e $> 50\%$; grave $VEF1 < 50\%$ e $> 30\%$ e muito grave quando $VEF1 < 30\%$ (GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE, 2018).

Quando se avaliou diferenças entre os grupos foram realizadas 2 análises comparando as principais variáveis do teste de washout de nitrogênio: ΔN_2 750-1250ml (%), Slope de fase III (%) e Capacidade de fechamento (%). Primeiro foram comparados os grupos DPOC com mutação do gene SERPINA 1 e DPOC exclusivamente por tabagismo. Posteriormente, foram

comparados os grupos DPOC com mutação grave do gene SERPINA 1 e DPOC exclusivamente por tabagismo.

Como o teste de washout teria sensibilidade para avaliação de alteração pulmonar em pacientes com carga tabágica a partir de 10 maços/ano e houve achados com significância estatística relacionados a Capacidade de Fechamento (%) optou-se posteriormente em reorganizar os indivíduos do estudo e separa-los em novos grupos que diferiam dos originais: sendo o primeiro grupo constituído por pacientes com DPOC e mutação que apresentavam carga tabágica < 10 maços/ano e o segundo grupo constituído por pacientes com DPOC sem mutação e carga tabágica > 10 maços/ ano. Comparou-se então esses novos grupos para as variáveis do teste de washout e foram comparados também seus dados clínicos e funcionais.

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CAAE: 55174616.3.0000.5259) (ANEXO 1) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1) antes de realizar qualquer procedimento do estudo.

5 RESULTADOS

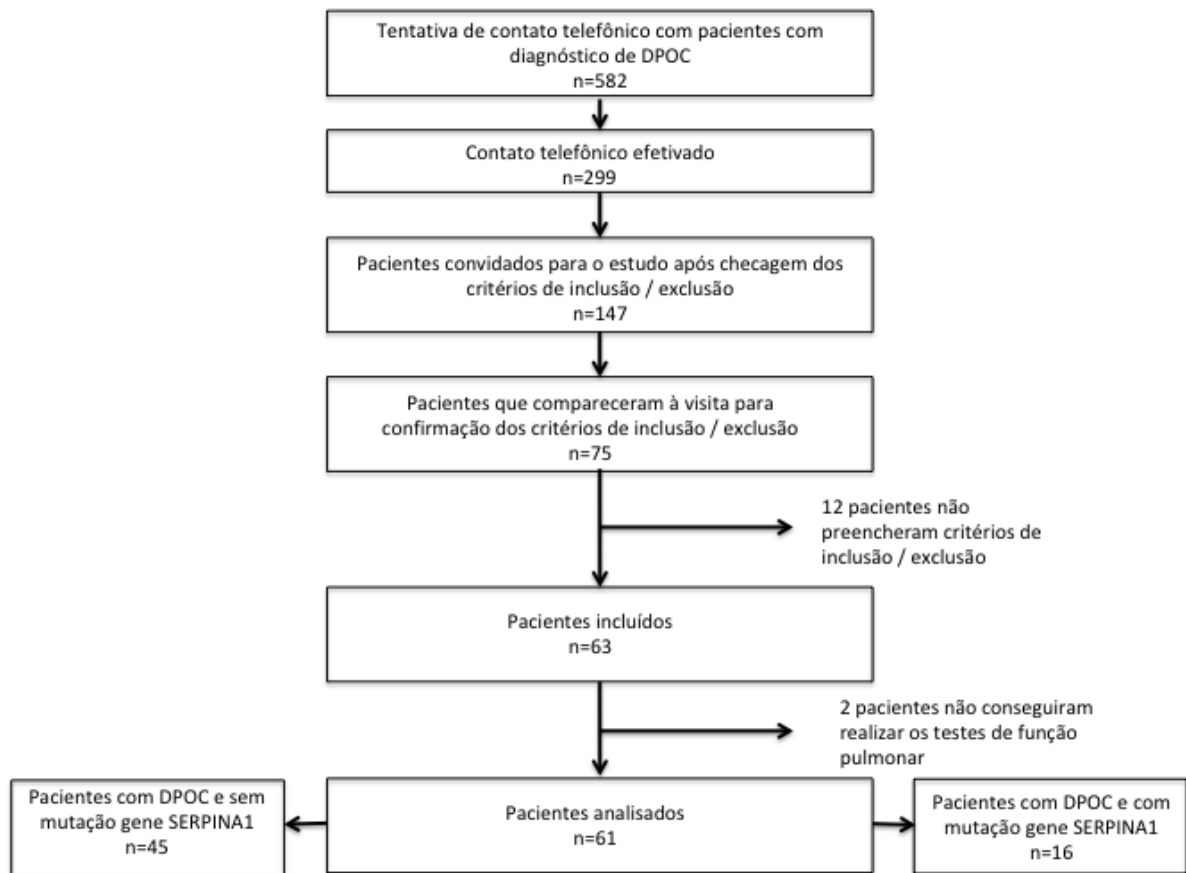
5.1 Seleção dos pacientes

Foi tentado contato telefônico de forma aleatória com 582 pacientes que estavam sendo acompanhados no ambulatório de DPOC da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Desses, 299 pacientes atenderam; 5 pacientes haviam falecido (conforme relato de familiares) e 277 não atenderam ou estavam com o número errado no cadastro. Dos 299 pacientes contatados com sucesso, 147 pareciam ser elegíveis para participar do estudo e foram convidados a comparecer na instituição. Destes, 75 efetivamente compareceram na data marcada para realizar os exames.

Os critérios de inclusão e exclusão foram aplicados nos 75 pacientes e verificou-se que 12 deles não estavam aptos para realizar o estudo naquele momento devido a exacerbações vigentes ou recentes e 2 apresentaram dificuldade em realizar as manobras solicitadas.

Dentre os 582 pacientes contatados, 46 apresentavam gene SERPINA 1 mutado; dentre os que foram contatados, se interessaram em participar, eram elegíveis e compareceram para a realização do estudo, 16 pacientes. Dentre esses 16 pacientes com algum tipo de mutação, 5 apresentavam mutações graves. Sendo assim, ao final da seleção dos 61 pacientes participantes, 45 não apresentavam mutação do gene SERPINA1 e 16 apresentavam, sendo 5 deles com mutações graves (Figura1).

Figura 1 - Fluxograma de recrutamento



Legenda: DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; n: número de indivíduos; SERPINA1: serin protease inibidor; Pi: protease inibidor.

5.2 Avaliação clínica e funcional

Dentre os 61 participantes, 33 eram mulheres e a média de idade foi de 65,5 (DP 7,61) anos. Dividindo em dois grupos, com e sem mutação do gene SERPINA1, não observamos diferença significativa entre os achados das variáveis VEF1/CVF, VEF1%, CVF%, CPT%, VR%, VR/CPT%, DLCO% e KCO%, ou seja, os valores espirométricos, volumes pulmonares estáticos e capacidade de difusão ao monóxido de carbono foram semelhantes nos dois grupos. No entanto, observou-se diferença estatisticamente significativa da carga tabágica, sendo que a média no grupo com a mutação do gene foi de 28,06 + 25,10 m/a e a média dos pacientes com DPOC exclusivamente tabágico foi de 75,57 + 56,11 m/a como demonstrado na Tabela 1. O tabagismo também foi significativamente diferente na comparação entre os grupos de pacientes com DPOC e mutação grave do gene SERPINA 1 e pacientes com

DPOC sem mutação. As comparações entre estes dois grupos através dos dados clínicos e funcionais está demonstrado na Tabela 2. Na Tabela 3 estão discriminadas quais as mutações encontradas no gene SERPINA 1 incluídas no estudo.

Tabela 1 - Avaliação das diferenças clínicas e funcionais entre os grupos de pacientes com DPOC com e sem mutação do gene da SERPINA 1

Variável	Mutação	N	Média	DP	Valor de p
Idade (anos)	Sim	16	65,56	7,55	0,586
	Não	45	66,78	7,65	
Carga tabágica (maços-ano)	Sim	16	28,06	25,0	0,001
	Não	45	75,57	56,11	
VEF ₁ /CVF%	Sim	16	50,96	12,43	0,412
	Não	45	53,55	10,14	
VEF ₁ %	Sim	16	56,81	21,49	0,486
	Não	45	61,71	19,09	
CVF%	Sim	16	86,31	16,64	0,408
	Não	45	91,60	19,58	
CPT%	Sim	14**	124,86	31,75	0,670
	Não	42***	122,57	46,02	
VR %	Sim	14**	179,07	72,39	0,264
	Não	42***	166,90	109	
VR/CPT%	Sim	14**	140,79	33,22	0,272
	Não	42***	131,71	26,42	
DLCO%	Sim	15*	85,53	30,29	0,141
	Não	45	72,76	18,65	
KCO%	Sim	16	96,63	19,95	0,235
	Não	45	88,56	24,09	

Legenda: n: número de indivíduos incluídos na análise; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância; VEF₁/CVF: relação volume expiratório forçado no primeiro segundo/capacidade vital forçada; VEF₁: volume respiratório forçado no primeiro segundo; CVF (%): capacidade vital forçada; CPT(%): capacidade pulmonar total; VR (%): volume residual; DLCO(%) difusão do monóxido de carbono; KCO(%): constante de Krogh.; (*): um paciente não conseguiu realizar manobra respiratória; (**):

dois pacientes não conseguiram realizar manobra respiratória: (**): três pacientes não conseguiram realizar manobra respiratória.

Tabela 2 - Avaliação das diferenças clínicas e funcionais entre os grupos de pacientes com DPOC com mutação grave do gene SERPINA 1 e com DPOC sem mutação.

Variável	Mutação	N	Média	DP	Valor de p
Idade (anos)	Grave	5	60,20	4,44	0,073
	Sem	45	66,78	7,65	
Carga tabágica (maços-ano)	Grave	5	9,00	13,42	0,001
	Sem	45	75,57	56,11	
VEF ₁ /CVF	Grave	5	49,92	11,19	0,487
	Sem	45	53,55	10,14	
VEF ₁ %	Grave	5	48,40	16,23	0,213
	Sem	45	61,71	19,09	
CVF%	Grave	5	77,80	17,54	0,141
	Sem	45	91,60	19,58	
CPT%	Grave	4	114,75	15,69	0,830
	Sem	42**	122,57	46,02	
VR %	Grave	4*	180,75	43,12	0,267
	Sem	42**	166,90	109,00	
VR/CPT%	Grave	4*	155,50	27,55	0,094
	Sem	42**	131,71	26,42	
DLCO%	Grave	5	67,00	30,01	0,561
	Sem	45	72,76	18,65	
KCO%	Grave	5	101,80	9,86	0,231

Sem	45	88,56	24,09
-----	----	-------	-------

Legenda: n: número de indivíduos incluídos na análise; DP: desvio padrão; P: probabilidade de significância; VEF1/CVF: relação volume expiratório forçado no primeiro segundo/capacidade vital forçada; VEF1: volume respiratório forçado no primeiro segundo; CVF (%): capacidade vital forçada; CPT(%): capacidade pulmonar total; VR (%): volume residual; DLCO(%) difusão do monóxido de carbono; KCO(%): constante de Krogh.. (*): um paciente não conseguiu realizar manobra respiratória; (**): três pacientes não conseguiram realizar manobra respiratória.

Tabela 3 - Variações das mutações do gene SERPINA 1 dos pacientes incluídos no estudo

Variações de Mutação Gene SERPINA 1	Número de pacientes
PiMS	8
PiMZ	3
PiZZ*	4
PiSS	0
PiSZ*	0
PiMNull*	1
Total	16

Legenda: SERPINA: serin protease inibidor; Pi: protease inibidor; Null: mutação chamada nula, que se caracteriza por ausência na produção de qualquer quantidade de alfa-1-antitripsina. (*) Mutações graves do gene SERPINA 1.

5.3 Estudo de *washout* de nitrogênio

Foram avaliadas as variáveis ΔN_2 750-1250ml (%), Slope de fase III (%) e Capacidade de fechamento(%) e realizadas 2 análises ou seja, comparações entre os grupos: análise 1 - DPOC com mutação do gene SERPINA 1 e DPOC exclusivamente por tabagismo; análise 2 - DPOC com mutação grave do gene SERPINA 1 e DPOC exclusivamente por tabagismo.

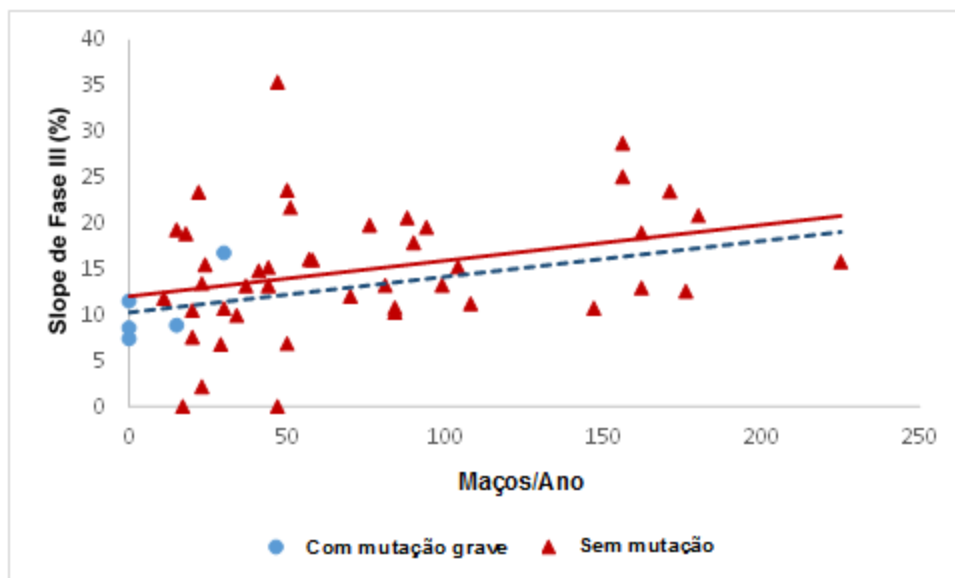
Para comparação dos grupos foi considerada a variável tabagismo calculada em maços-ano já que no grupo com mutação haviam casos de fumantes. A idéia da inclusão desta variável no modelo foi efetuar-se a retirada do efeito do cigarro, dado o fato do cigarro ter relação com a doença. Os dados podem ser visualizados na Tabela 4 e gráfico 1.

Tabela 4 - Teste de *washout* em pacientes com DPOC, estratificados por mutação do gene SERPINA1

	Todas as mutações SERPINA1	Mutações graves SERPINA1	Sem mutações SERPINA1
N	16	5	45
CT (maços/ano)	26,2	9	76,2
ΔN_2 750-1250ml (%)	6,28	5,09	7,27
Slope de fase III (%)	13,57	10,64*	14,97*
CF(%)	105,90	118,10	45,38

Legenda: DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; CT: carga tabágica; m-a: maços-ano; n: número de indivíduos incluídos na análise; ΔN_2 750-1250ml (%): variação do nitrogênio entre 750 e 1250 mL; CF: Capacidade de fechamento; (*) Houve diferença estatisticamente significativa do Slope de fase III (%) entre o grupo de mutações graves e os pacientes sem mutação do gene SERPINA1 ($p=0,033$).

Gráfico 1 - Relação entre a carga tabágica medida em maços/ano com Slope de fase III (%) comparação entre grupos DPOC com mutação grave do gene SERPINA 1 e DPOC por tabagismo



5.4 Relação com carga tabágica – capacidade de fechamento(%) sem outlier

Seguiu-se com a análise estatística e foi percebido que havia evidência de que a relação da carga tabágica com a variável Capacidade de Fechamento (%) era diferente entre 2 grupos de pacientes: DPOC com mutação do gene SERPINA 1 e DPOC exclusivamente por tabagismo.

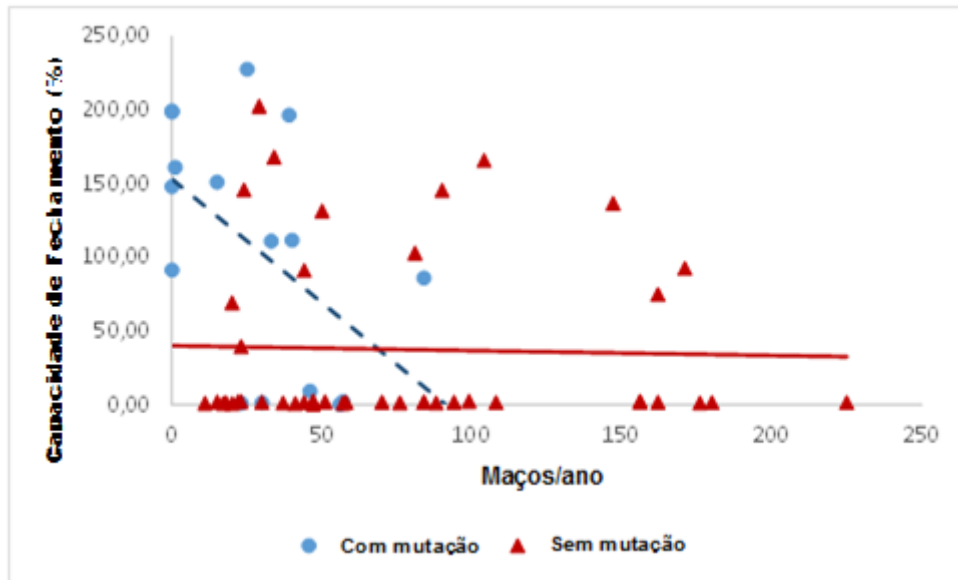
No grupo sem mutação não há evidência que o número de maços/ano influencie o resultado de Capacidade de Fechamento (%). Já no grupo com mutação encontrou-se evidência de que haja influência do número de maços/ano sobre Capacidade de Fechamento (%) ($p=0,014$). Estima-se que para cada unidade de aumento do número de maços/ano haja uma diminuição de 1,68 unidades de Volume de Fechamento (%) (Tabela 5 e gráfico 2).

Tabela 5 – Relação entre a Capacidade de fechamento (%) e carga tabagica de pacientes com mutação do gene do gene SERPINA 1

Carga tabágica (m/a)	CF (%) em pacientes com Mutação	CF (%) em pacientes sem Mutação	Valor de p
5	144,64	39,69	<0,001
10	136,24	39,52	<0,001
15	127,84	39,36	<0,001
20	119,45	39,19	0,001
25	111,05	39,03	0,001
30	102,65	38,86	0,003
40	85,85	38,53	0,032
60	52,26	37,87	0,616

Legenda: CF: capacidade de fechamento (%) ; m/a: maços-ano; p: probabilidade de significância .

Gráfico 2 - Associação entre a carga tabágica com Capacidade de Fechamento (%) em pacientes com mutação do gene SERPINA1 e DPOC por tabagismo Carga tabágica (maços-ano)



5.5 Comparação de pacientes com DPOC, mutação do gene SERPINA1 e carga tabágica até 10 m/a com pacientes DPOC exclusivamente tabágicos e carga tabágica > 10 m/a.

Na tabela 6 abaixo são apresentadas as estatísticas descritivas da variável Capacidade de Fechamento (%) dentro de cada grupo.

Tabela 6 - Capacidade de Fechamento (%) entre grupos DPOC por tabagismo e DPOC com mutação do gene SERPINA1 e carga tabágica baixa

	Sem mutação do gene SERPINA1	Com mutação do gene SERPINA1	Valor de p
N	45	5	
Carga tabágica (m/a)	> 10m/a	< 10m/a	
CF(%); Média (DP)	44,5 (79)	159,7 (44)	0,003

Legenda: CF(%): Capacidade de fechamento (%); Considerou-se carga tabágica baixa aquela < 10maços-ano; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; n: número de indivíduos incluídos na análise; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância.

Na tabela 7 abaixo são apresentadas as estatísticas descritivas clínicas e funcionais dentro de cada grupo.

Tabela 7 – Comparação clínica e funcional entre grupos DPOC por tabagismo e DPOC com mutação do gene SERPINA1 e carga tabágica baixa

Variável	Mutação	Carga tabágica de até 10m/a	N	Média	DP	Valor de p
Idade (anos)	Sim	Sim	5	65,20	9,23	0,561
	Não	Não	45	66,78	7,65	
Carga tabágica (maços-ano)	Sim	Sim	5	0,20	0,45	0,000
	Não	Não	45	75,57	56,11	
VEF1/CVF	Sim	Sim	5	55,40	10,62	0,662
	Não	Não	45	53,55	10,14	
VEF1%	Sim	Sim	5	53,40	19,35	0,628
	Não	Não	45	61,71	19,09	
CVF%	Sim	Sim	5	74,40	14,62	0,029
	Não	Não	45	91,60	19,58	
CPT%	Sim	Sim	4*	107,75	2,87	0,034
	Não	Não	42**	122,57	46,02	
VR %	Sim	Sim	4*	163,25	38,54	0,633
	Não	Não	42**	166,90	109,00	
VR/CPT%	Sim	Sim	4*	149,25	29,84	0,785
	Não	Não	42**	131,71	26,42	
DLCO%	Sim	Sim	4*	60,50	30,03	0,195
	Não	Não	45	72,76	18,65	
KCO%	Sim	Sim	5	96,00	6,67	0,571
	Não	Não	45	88,56	24,09	

Legenda: n: número de indivíduos incluídos na análise; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância; VEF1/CVF: relação volume expiratório forçado no primeiro segundo/capacidade vital forçada; VEF1: volume respiratório forçado no primeiro segundo; CVF (%): capacidade vital forçada; CPT(%): capacidade pulmonar total; VR (%): volume residual; DLCO(%) difusão do monóxido de carbono; KCO(%): constante de Krogh.. (*): um paciente não conseguiu realizar manobra respiratória; (**): três pacientes não conseguiram realizar manobra respiratória.

5.6 Classificação da gravidade do DPOC

Testou-se também se as principais variáveis do teste de *washout* de nitrogênio seriam capazes de classificar os graus de gravidade de DPOC como é feito na espirometria pela medida da limitação ao fluxo aéreo em leve, moderada, grave e muito grave utilizando-se o VEF1%. Como o número de pacientes do grupo muito grave era pequeno, optou-se por considerar os pacientes graves e muito graves em um mesmo grupo. Assim, foram incluídos todos os pacientes com DPOC para esta análise, independente de terem mutação do gene SERPINA1 ou não. Os dados estão dispostos na tabela 8 abaixo.

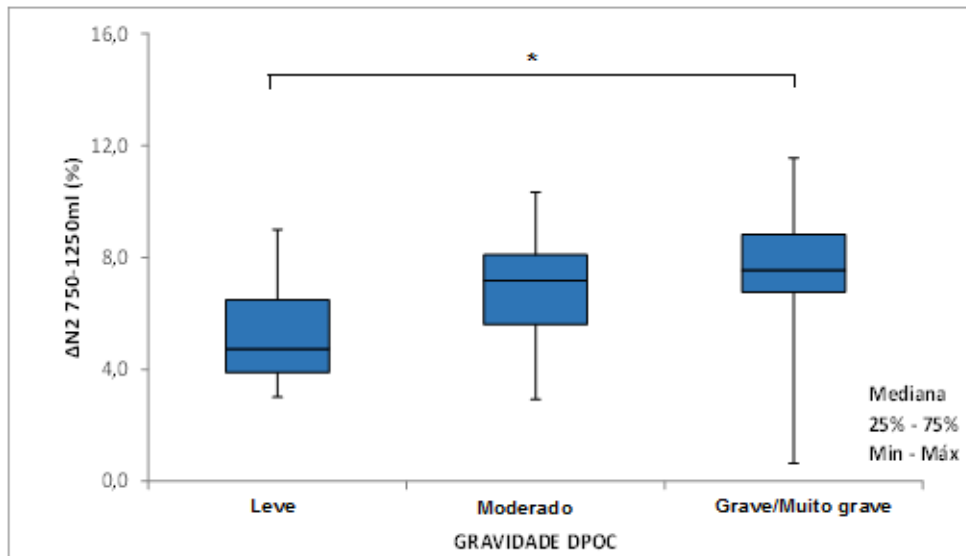
Nas avaliações quanto as variáveis ΔN_2 750-1250mL (%) e Slope de fase III (%) os resultados foram estatisticamente significativos e podem ser visualizados nos Gráficos 3 e 4.

Tabela 8 - Teste de washout em pacientes com DPOC leve, moderado e grave/muito grave, de acordo com o VEF1

	DPOC Leve	DPOC Moderado	DPOC grave/muito grave	Valor de p
N	10	30	21	
ΔN_2 750-1250mL (%)	5,38 (2,1)	7,01 (1,6)	7,63 (2,1)	0,027
Slope de fase III (%)	7,24 (6,9)	15,21 (6,3)	17,11 (6,6)	0,001
CF(%)	79,01 (86,8)	47,65 (88,0)	70,12 (77,9)	0,554

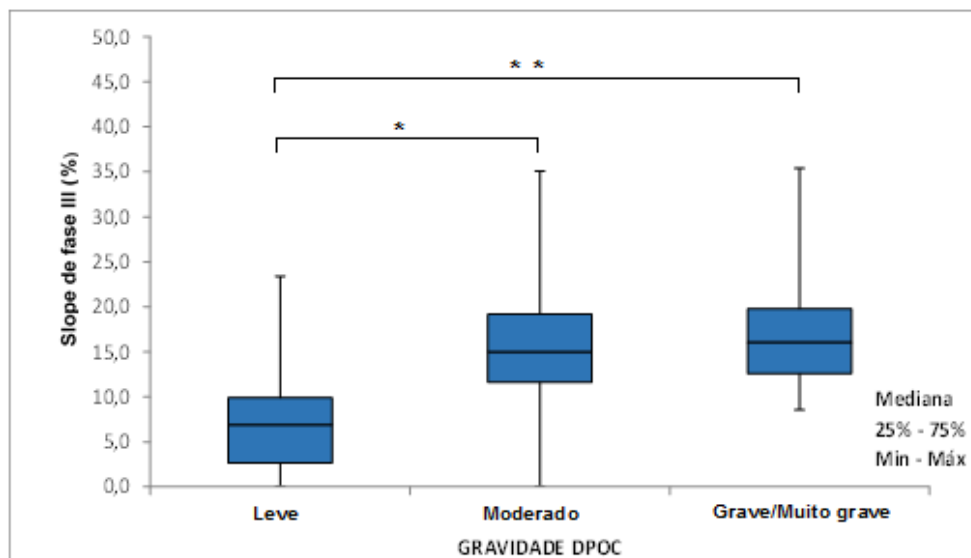
Legenda: n: número de indivíduos incluídos na análise VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; CF(%): capacidade de fechamento(%).

Gráfico 3 - Médias da ΔN_2 750-1250ml (%) em pacientes com DPOC estratificados de acordo com a gravidade



Legenda: DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; ΔN_2 750-1250ml (%): variação do nitrogênio entre 750 e 1250 ml; (*) p (probabilidade de significância) < 0,05 (p=0,007)

Gráfico 4 - Médias do Slope de fase III (%) em pacientes com DPOC estratificados de acordo com a gravidade



Legenda: DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; (*) p (probabilidade de significância) < 0,005; (**) p < 0,001.

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação dos dados clínicos e funcionais

Pelo nosso conhecimento, esse foi o primeiro estudo a avaliar as pequenas vias aéreas e a distribuição da ventilação através do teste de washout de nitrogênio em pacientes com DPOC com e sem mutação do gene SERPINA 1.

No presente estudo, os grupos avaliados continham números diferentes de participantes, o de DPOC com mutação do gene SERPINA 1 (uma mutação escassa na população) possuía 16 indivíduos e o de DPOC por tabagismo exclusivo (acometimento de maior frequência), 45 indivíduos. As características clínicas e funcionais eram semelhantes, exceto pelo tabagismo que foi significativamente menor nos pacientes que possuíam a mutação. O número de pacientes com mutação grave do gene SERPINA 1 foi pequeno e se resumia a 5 pacientes. E quando comparados os dados clínicos dos grupos com DPOC sem mutação e com mutação grave apenas a carga tabagica apresentou diferença significativa.

Dos 16 pacientes com mutação do gene SERPINA 1, 11 apresentavam histórico de tabagismo prévio apesar de terem uma carga tabágica menor, demonstrando um número significativo de pacientes, no nosso estudo, com ambos fatores de risco para o desenvolvimento de DPOC. Esse fato corrobora as recomendações recentes da Organização Mundial da Saúde e das sociedades respiratórias americanas e europeias (ATS e ERS), que orientam a dosagem da alfa-1 antitripsina ao menos uma vez em todos os pacientes diagnosticados com DPOC, para facilitar o reconhecimento e a orientação desses indivíduos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY, 2003).

Apesar de as pequenas vias aéreas serem de grande importância clínica, a maioria dos estudos são pontuais e têm focado predominantemente na detecção precoce da doença de pequenas vias aéreas devido à inalação de fumaça do cigarro (MILLIC-EMILI; TORCHIO; D'ANGELO, 2007). Entretanto é importante salientar que o enfisema, de qualquer causa, aumenta os espaços aéreos, diminui a comunicação com espaços alveolares e pequenas vias aéreas. Isso prejudica a perfusão microvascular e acarreta uma má distribuição da ventilação. Entretanto, essa grande repercussão na distribuição da ventilação não consegue ser avaliada através dos testes de função pulmonar tradicionais (BOECK et al, 2016; DEUS et al, 2018).

Por isso, a importância do teste de washout de nitrogênio, através do qual o Slope de fase III é capaz de prever doença precoce das pequenas vias aéreas nos pacientes fumantes que ainda não tem o diagnóstico de DPOC. Porém ainda há dúvidas se alterações precoces nessa região do pulmão quando identificadas por testes com maior sensibilidade (como o washout) poderiam ser reversíveis já que essas alterações seriam identificadas em pacientes com cargas tabágicas pequenas, a partir de 10m/a. Isso demonstra uma alta sensibilidade a doenças tabaco-relacionadas que poderiam ser diagnosticadas inclusive em pacientes que tenham parado de fumar ou que ainda conceitualmente não desenvolveram doença. Há relatos de que as alterações vistas nas provas de função não tradicionais possam ser reversíveis com a cessação do tabagismo (BOECK et al, 2016).

Nosso estudo comparou pacientes com DPOC com e sem mutação do gene SERPINA1 utilizando as seguintes variáveis do teste de washout de nitrogênio: ΔN_2 750-1250mL (%), Slope de fase III (%) e Capacidade de fechamento (%). Posteriormente, foram selecionados apenas os pacientes com mutações grave no gene da SERPINA 1 para ser comparado com o grupo de pacientes sem mutação (DPOC tabágico). Somente na variável Slope de fase III (%) na comparação entre os grupos com mutação grave do gene SERPINA 1 e o grupo com DPOC sem mutação (tabágico) apresentou uma diferença com significância estatística, demonstrando maior heterogeneidade na ventilação pulmonar no grupo com DPOC e sem mutação do gene SERPINA 1/deficiência de alfa-1 antitripsina.

Durante as análises estatísticas foi notado que no grupo com mutação do gene SERPINA 1 o valor da Capacidade de Fechamento (%) de um indivíduo era muito diferente dos demais (outlier); esse indivíduo foi excluído das análises seguintes e foram realizadas correlações lineares das variáveis do washout de nitrogênio com a carga tabágica. Um achado interessante foi uma correlação positiva e de maneira inversamente proporcional da quantidade de maços/ano com a Capacidade de Fechamento (%) somente no grupo de pacientes com mutação do gene SERPINA 1. O resultado encontrado foi oposto ao esperado porque, conforme mostra a literatura, a Capacidade de fechamento (%), ou seja, a fase IV está aumentada nos pacientes com DPOC e aumentaria com a gravidade (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016).

Pouca informação está disponível na literatura a respeito da Capacidade de Fechamento (%), já que essa variável é derivada do Volume de Fechamento (%). O Volume de fechamento (VF) se inicia após a fase III, que representa a expiração do ar alveolar; o fechamento é progressivo e ascendente e é representado pela curva de expiração do nitrogênio que se eleva progressivamente em indivíduos hígidos até atingir o fechamento dos ápices

pulmonares onde o nitrogênio está mais concentrado (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016). Na prática, o VF é usado para medir a diferença do volume desde o fechamento das pequenas vias aéreas até o volume residual (MILLIC-EMILI; TORCHIO; D'ANGELO, 2007).

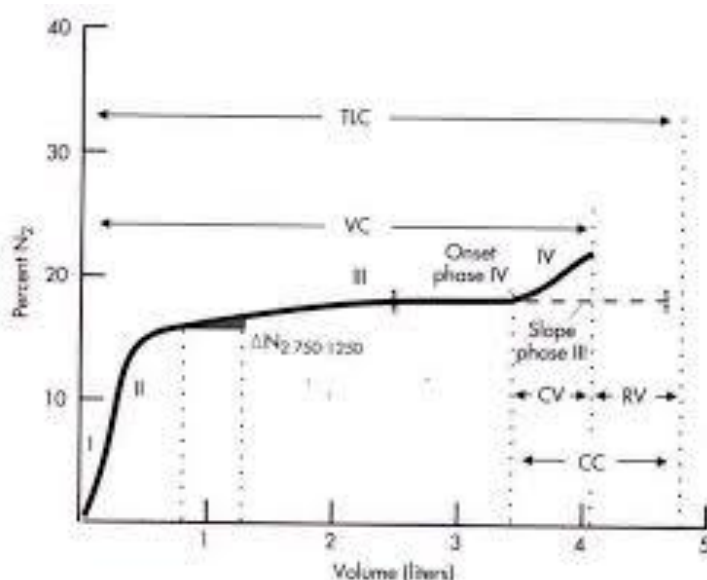
Para explicar o traçado do volume de fechamento obtido em condições normais, um modelo simples foi proposto, baseado na suposição de que as propriedades intrínsecas dos pulmões são uniformes, que existe uma única pressão de fechamento das vias aéreas e que alterações de pressão pleural sejam as mesmas em todas as regiões do pulmão. Apesar desses critérios não serem cumpridos, nem mesmo em pulmões considerados normais é possível a compreensão dos mecanismos envolvidos na geração dos traçados do volume de fechamento (MILLIC-EMILI; TORCHIO; D'ANGELO, 2007). Por exemplo, segmentos isolados dos pulmões se expandem de maneira uniforme, mas dentro do tórax esse comportamento é diferente e deve-se principalmente ao fato de que a pressão pleural no tórax intacto possui um gradiente vertical tendo valores mais negativos nas porções superiores, conseqüentemente, a pressão transpulmonar é maior nas zonas superiores e as unidades superiores são mais expandidas do que as inferiores (MILLIC-EMILI; TORCHIO; D'ANGELO, 2007).

Um estudo que avaliou os efeitos da gravidade na heterogeneidade da perfusão pulmonar em humanos na ausência de gravidade, durante a missão Spacelab Life Science, demonstrou diminuição significativa na elevação da curva da fase VI quando os exames foram realizados sem gravidade, confirmando que o fechamento das vias aéreas ocorre primeiro nas regiões pulmonares dependentes da gravidade (bases), e que a curva de declive da fase IV se relaciona fortemente com a topografia da heterogeneidade da ventilação (PRISK et al, 1995), ou seja se a diferença entre ápice e base tende a se igualar e a elevação da curva da fase IV tende a achatarse.

O washout de nitrogênio depende das diferenças de concentração de nitrogênio em cada região do pulmão e é determinado pelas diferenças nas propriedades mecânicas nas diferentes regiões das vias aéreas. Em um indivíduo normal, se consegue definir as fases III e IV com precisão. Nessas condições, o Slope de fase III se mantém constante e o último ponto antes do aumento abrupto na curva e na concentração de nitrogênio representa o início da fase IV, conforme demonstrado na Figura 2. Em pacientes com doenças pulmonares, o Slope de fase III aumenta progressivamente com a gravidade da doença refletindo uma diluição desigual do gás alveolar e a variação entre as fases III e IV pode se tornar menos evidente conforme as doenças progridem. Já nos pacientes com doença mais grave, pode-se ter um

Slope de fase III com uma elevação tão importante o que dificultaria a identificação do início da fase IV (BARBINI, 2013).

Figura 2 - Quantidade de nitrogênio exalado nos diferentes estágios do teste de washout de nitrogênio



Legenda: TLC: Capacidade pulmonar total; CV: volume de fechamento; RV: volume residual; CC: capacidade de fechamento; ΔN_2 750-1250mL: variação do nitrogênio exalado entre 750 e 1250 ml exalados. Fonte: LOPES A.J. A retomada do teste do washout do nitrogênio na prática pneumológica. Diretoria da SOPTERJ-BIÊNIO 2014/2015, v. 24, n. 1, p. 14-18, 2015.

Sendo assim, neste estudo o dado que demonstra uma relação inversamente proporcional entre o tabagismo e os valores de Capacidade de Fechamento (%) somente no grupo com mutação do gene SERPINA 1, dado contrário ao esperado, poderia ser justificado de duas maneiras, ou seja, teríamos 2 hipóteses para tentar entender essa correlação inversa. Na primeira delas, considerariamos que os pacientes com mutação do gene SERPINA 1 com carga tabágica progressivamente maior seriam paciente progressivamente mais graves. Assim, esses pacientes teriam uma elevação muito importante do Slope de fase III que pudesse dificultar a identificação do ponto de início da fase IV, o que nos mostraria uma fase IV proporcionalmente e disfarçadamente achatada e com valor menor. Um aumento proporcional do Slope de fase III em relação à redução da Capacidade de Fechamento (CF) foi testada neste estudo e não pode ser comprovada. Uma redução proporcional de VEF1 e de outras variáveis dos testes de função pulmonar também não foram comprovadas neste estudo.

A segunda hipótese levantada seria baseada na observação de Lapperre que relatou que alterações na distribuição topográfica da ventilação também alterariam os resultados do

teste de washout de nitrogênio (LAPPERRE et al, 2007). Assim, a segunda hipótese explicaria o achado considerando que nos pacientes com DPOC tabágico o enfisema predominaria em ápices (relacionado a partículas inaladas) e que os pacientes com mutação/deficiência de alfa-1 antitripsina o enfisema seria de predomínio basal; e ainda pacientes com mutação do gene SERPINA 1 e fumantes tenderiam a apresentar um enfisema difuso. Portanto, considerando que as variações na distribuição da pressão pleural e transpulmonar alteraram a elevação na curva da fase IV e que as diferenças de pressão nas regiões topográficas pulmonares quando mais pronunciadas levariam ao aumento da curva/valor da fase IV e que uma maior homogeneidade entre pressões do ápice e da base levariam a um aumento menos pronunciado da curva da fase IV. Um paciente com DPOC predominantemente em ápices elevaria os valores da fase IV devido a uma diferença importante de acometimento entre a base preservada e o ápice doente, enquanto uma doença difusa tenderia a diminuir a curva da fase IV por tender a igualar as diferenças entre ápices e bases, já que ambos se apresentariam doentes. Portanto, levantamos a possibilidade de que o CF poderia prever uma diferença na localização anatômica de lesões pulmonares demonstrando através de um valor maior um acometimento mais pronunciado das vias aéreas superiores; e de um valor alterado, porém menos pronunciado, demonstrando um acometimento mais difuso e de bases pulmonares.

Como o teste de washout teria sensibilidade para avaliação de alteração pulmonar em pacientes com carga tabágica a partir de 10 maços/ano e houve achados com significância estatística relacionados ao Capacidade de Fechamento(%) optou-se posteriormente em reorganizar os indivíduos do estudo e separa-los em novos grupos que diferiam dos originais: sendo o primeiro grupo constituído por de pacientes DPOC com mutação e carga tabágica de até 10 maços/ano e o segundo grupo constituído por pacientes DPOC sem mutação e carga tabágica maior que 10 maços/ ano. Testou-se então esses novos grupos para as variáveis do washout e foram comparados seus dados clínicos e funcionais. Na comparação houve uma diferença significativa entre os grupos pela variável de washout de Capacidade de fechamento (%). A diferença justificada pela gravidade da limitação ao fluxo aéreo foi testada, mas não foi comprovada, já que não houve diferença significativa entre os grupos quando analisados os VEF1. Entretanto quando analisados os demais dados funcionais, havia uma diferença com significância estatística entre os grupos nos valores de CVF e da CPT sendo esses valores maiores no grupo com uma carga tabágica maior que 10m/a. Sendo assim, se levanta a questão de que a alteração do Capacidade de Fechamento (%) poderia estar refletindo essa diferença de capacidade pulmonar entre os grupos.

6.2 Classificação da gravidade de DPOC

Nos artigo de Konstantinos e Boek foi demonstrada a capacidade das variáveis do teste de washout de nitrogênio em diferenciarem a gravidade de pacientes DPOC como é feito pela espirometria em relação à limitação do fluxo aéreo (BOECK et al, 2016; KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016). Os autores referem que a capacidade de fechamento e do volume de fechamento, assim como o slope de phase III se correlacionam com a gravidade da limitação do fluxo aéreo em pacientes com DPOC (BOECK et al, 2016; KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016). Neste trabalho o Slope de phase III foi capaz de se relacionar com níveis de gravidade de DPOC diferenciando pacientes leves de moderados, e leves de graves/muito graves. A variável ΔN_2 750-1250ml (%) também foi capaz de se relacionar com gravidade do DPOC diferenciando os pacientes com DPOC leve de pacientes com DPOC grave/muito grave. Entretanto a capacidade de fechamento (%) não foi capaz, nesse estudo, de diferenciar gravidade entre os pacientes com DPOC.

Boek et al, assim como neste estudo, mostrou que o slope de fase III apresenta relação com a gravidade da DPOC, mas ressalta que o VEF1 continua sendo o melhor preditor de gravidade da doença. O autor relacionou ainda o Slope de fase III com a gravidade da dispneia aferida através da escala MmRC, com dessaturação e com resultados do teste de caminhada de 6 minutos (BOECK et al, 2016).

Os pacientes do nosso estudo foram divididos em subgrupos de acordo com a gravidade da doença, o que resultou em subgrupos pequenos com número reduzido de indivíduos. Esse fato pode ter contribuído para que não obtivéssemos correlações positivas entre todos os níveis de gravidade da doença com as variáveis ΔN_2 750-1250ml (%) e Slope de fase III e que não obtivéssemos correlações positivas em relação a Capacidade de Fechamento (%). Tivemos dificuldades semelhantes ao autor Mikamo et al, que ressaltou que apesar da avaliação através da manobra de respiração única do teste de washout de nitrogênio ser de fácil realização para escolares e adultos, os pacientes com DPOC de maior gravidade podem apresentar dificuldades (MIKAMO et al, 2013). Na nossa experiência, além dos pacientes DPOC muito graves apresentarem maior dificuldade em realizar manobras exigidas nos testes de função respiratória, eles também apresentam maior dificuldade para se locomover até o centro de estudo, o que dificultou a inclusão desse grupo de pacientes na pesquisa.

6.3 Proposta de aplicabilidade do teste de washout na DPOC e mutação do gene SERPINA-1/deficiência de alfa-1 antitripsina

Há evidências crescentes de que pacientes com DPOC com VEF1 relativamente bem preservado podem apresentar enfisema substancial na tomografia computadorizada (TC) e que essas anormalidades estão associadas a desfechos significativos centrados no paciente, incluindo falta de ar e intolerância ao exercício (DEUS et al, 2018; KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016). A avaliação e o monitoramento das pequenas vias aéreas envolvidas nas patologias como a asma e o DPOC é um desafio porque essa região pulmonar é praticamente inacessível para os métodos de avaliação pulmonar tradicionais. Até o momento não há testes com valores de corte amplamente aceitos para medir a presença e a severidade do envolvimento das pequenas vias aéreas. Na obstrução das pequenas vias aéreas ocorre fechamento prematuro, aprisionamento aéreo e heterogeneidade regional. Portanto testes que focam nessas características como o washout de nitrogênio podem ser utilizados para a detecção e quantificação do acometimento das pequenas vias aéreas (KONSTANTINOS; KOSTIKAS; KONTAKIOTIS, 2016).

Conforme relatado por Milic-Emili, os estudos descritos na literatura com objetivo de estudar as pequenas vias aéreas na DPOC são poucos e se restringem à avaliação inicial de pacientes expostos ao tabagismo, nada ainda foi relatado a respeito da DPOC por outras causas, como à deficiência da alfa-1 antitripsina (MILLIC-EMILI; TORCHIO; D'ANGELO, 2007).

Mais estudos nesse sentido poderiam nos ajudar a esclarecer a fisiopatologia inicial da doença. Farah, por exemplo, realizou um estudo que conseguiu relacionar mesmo que de maneira fraca a doença em pequenas vias aéreas e a presença de neutrofilia no escarro (FARAH et al, 2015). O mecanismo que explica a relação entre inflamação neutrofílica e alteração no teste de washout requer novos estudos, mas neutrófilos estão presentes em grandes quantidades nas vias aéreas em comparação com a quantidade de eosinófilos. É possível que os neutrófilos exerçam uma lesão mais pronunciada nas pequenas vias aéreas pois a ativação de neutrófilos libera metaloproteinases e a elastase neutrofílica (FARAH et al, 2015). Recentemente o mesmo grupo demonstrou que o número de neutrófilos na lâmina própria das pequenas vias aéreas é maior do que da lâmina própria das grandes vias aéreas em tabagistas. Isso sugere que a distribuição de neutrófilos através da árvore traqueobrônquica não é uniforme (LAPPERRE et al, 2007).

O enfisema pela deficiência de alfa-1 antitripsina, por ter sua causa definida é considerado um bom modelo de estudo à respeito dos efeitos da terapia na modificação no curso da doença (CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, 2016). Atualmente estudos clínicos não têm demonstrado efeitos significativos na terapia de reposição, possivelmente por um número insuficiente de pacientes, curta duração dos estudos e desenhos de estudos pouco adequados. Um fator importante a ser considerado, é que os estudos clínicos realizados até o momento não avaliaram se há diferenças na progressão da doença entre grupos que iniciaram tratamento precoce e grupos que iniciaram tratamento tardio (LAPPERRE et al, 2007). No contexto do enfisema relacionado com DAAT, o tratamento apropriado e precoce parece ser importante para evitar a perda de tecido pulmonar, considerando que a terapia de reposição é o único tratamento farmacológico que atualmente aborda a causa subjacente da doença em DAAT e causa impacto na sua evolução. Afinal, a terapia protege o tecido parenquimatoso pulmonar e os alvéolos da degradação pela elastase neutrofílica e assim é capaz de reduzir o declínio da perda de função pulmonar atrasando o tempo até a insuficiência respiratória terminal e o transplante de pulmão. (BARRECHEGUREN; MIRAVITLLES, 2018; CHOROSTOWSKA-WYNIMKO et al, 2015).

Apesar de boa viabilidade e reprodutibilidade as medidas do teste de washout de nitrogênio no DPOC precisam ser validadas com objetivo de se ter um método não invasivo capaz de prever alterações precoces em áreas periféricas de parênquima pulmonar (USEMANN et al, 2017). A identificação precoce permite ainda monitorar a função pulmonar e avaliar a decisão terapêutica nos portadores de deficiência de alfa-1 antitripsina a administrar a terapia suplementar enquanto o paciente ainda tem função pulmonar preservada (GODOY, 2016).

6.4 Limitações do estudo

Devemos salientar que o estudo atual possui algumas limitações, especialmente no fato de incluir poucos pacientes com deficiência de alfa 1 antitripsina e que a maioria deles apresentavam história de tabagismo concomitante, o que restringe o poder de conclusão quantos as diferenças desses dois grupos de pacientes com DPOC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora não haja dúvida da grande importância das pequenas vias aéreas na gênese e desenvolvimento das doenças pulmonares em geral, muitas questões ainda se mantêm pendentes em relação a esse tema e a melhor forma de avaliação dessa região do pulmão. Esse foi o primeiro estudo a avaliar as pequenas vias aéreas através do teste de washout de nitrogênio em pacientes com mutação do gene SERPINA 1. Foi possível observar diferença na heterogeneidade da ventilação, pelo teste de washout, nos pacientes DPOC apenas pelo tabagismo com DPOC e deficiência de alfa-1 antitripsina e tanto o slope de phase III como o ΔN_2 750-1250mL (%) foram capazes de se relacionar com níveis de gravidade de DPOC. São necessários mais estudos para determinar o papel do washout de nitrogênio no estudo das pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC causados pelo tabagismo e pela mutação do gene SERPINA 1.

REFERÊNCIAS

1. AMERICAN THORACIC SOCIETY, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. **Am J Respir Crit Care Med.** 2003;168: 818–900.
2. AZEVEDO K.R.S. Avaliação Funcional Pulmonar na DPOC. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 2, p. 24-29, 2013.
3. BARBINI P.A. Functional Mathematical Model to Simulate the Single-Breath Nitrogen Washout. **Open Biomed Eng J.** 2013;7: 81–92.
4. BARKER, A.F; et al. Pharmacokinetic Study of α 1-Antitrypsin Infusion in α 1-Antitrypsin Deficiency. **Chest.** 1997;112: 607–613.
5. BARRECHEGUREN M.; MIRAVITLLES M. Augmentation therapy for emphysema due to alpha-1 antitrypsin deficiency. **Pro. Arch Bronconeumol.** 2018; doi:10.1016/j.arbres.2018.02.002.
6. BARRETO S.S.M., et al. Volumes pulmonares. **J Pneumol**, v. 28, n. Supl 3, p. 83-94, 2002.
7. BOECK L., et al. Single-Breath Washout Tests to Assess Small Airway Disease in COPD. **Chest.** 2016;150: 1091–1100
8. BRADI A.C., et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency in Canada: regional disparities in diagnosis and management. **COPD.** 2015;12 Suppl 1: 15–21.
9. CAMELIER A.A., et al. Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento. **J Bras Pneumol.** 2008;34: 514–527.
10. CASAS F., et al. Actualización sobre indicaciones de búsqueda activa de casos y tratamiento con alfa-1 antitripsina por vía intravenosa en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica asociada a déficit de alfa-1 antitripsina. **Archivos de Bronconeumología.** 2015;51: 185–192
11. CHAPMAN K.R., et al. Augmentation Therapy for α 1 Antitrypsin Deficiency: A Meta-Analysis. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** 2009;6: 177–184.
12. CHOROSTOWSKA-WYNIMKO J. Disease Modification in Emphysema Related to Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** 2016;13: 807–815.
13. CHOROSTOWSKA-WYNIMKO J., et al. The national alpha-1 antitrypsin deficiency registry in Poland. **COPD.** 2015;12 Suppl 1: 22–26.

- 14.COSTA C.A., SANTOS C. Déficit de alfa-1 antitripsina. A experiência do Hospital de Pulido Valente com a terapêutica de reposição. **Rev Port Pneumol**. 2009;15: 473–482.
- 15.DEUS C.A.L., et al. Nitrogen single-breath washout test for evaluating exercise tolerance and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Braz J Med Biol Res**. 2018;51.
- 16.FARAH C.S., et al. Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma. **Respirology**. 2015;20: 975–98
- 17.FARIA E.J. de, et al. Associação entre deficiência de alfa-1-antitripsina e a gravidade da fibrose cística. **J Pediatr** . 2005;81: 485–490.
18. GAUVAIN C.,et al. Health-related quality of life in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency: the French experience. **COPD**. 2015;12 Suppl 1: 46–51.
19. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. **Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Copd**: Full Repo 2018.
20. GODOY I. Diagnosing alpha-1 antitrypsin deficiency: does it prevent or improve the course of COPD? **J Bras Pneumol**. 2016;42: 307–308.
- 21.HUBBARD R.C. Biochemical Efficacy and Safety of Monthly Augmentation Therapy for α 1-Antitrypsin Deficiency. **JAMA**. 1988;260: 1259.
- 22.HUGHES J.M.B., PRIDE N.B. Examination of the Carbon Monoxide Diffusing Capacity (DICO) in Relation to Its Kcoand VaComponents. **Am J Respir Crit Care Med**. 2012;186: 132–139.
23. HUTSEBAUT J., et al. Activity of the Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Registry in Belgium. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**. 2015;12: 10–14.
- 24.KNUDSON R.J., et al. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. **Am Rev Respir Dis**. 1983;127: 725–734.
- 25.KONSTANTINOS K.K., KOSTIKAS K., KONTAKIOTIS T. Techniques for assessing small airways function: Possible applications in asthma and COPD. **Respir Med**. 2016;119: e2–e9.
26. LAPPERRE T.S., et al. Small airways dysfunction and neutrophilic inflammation in bronchial biopsies and BAL in COPD. **Chest**. 2007;131: 53–59.
27. LARA B. EPOC y déficit de alfa-1-antitripsina. **Archivos de Bronconeumología**. 2010;46: 2–8.
- 28.LARA B., MiRAVITLLES M. Spanish Registry of Patients With Alpha-1 Antitrypsin Deficiency; Comparison of the Characteristics of PISZ and PIZZ Individuals. **COPD**. 2015;12 Suppl 1: 27–31.

29. LOPES A.J. A retomada do teste do washout do nitrogênio na prática pneumológica. **Diretoria da SOPTEJ-BIÊNIO 2014/2015**, v. 24, n. 1, p. 14-18, 2015.
30. LOPES A.J., MAFORT T.T. Correlations between small airway function, ventilation distribution, and functional exercise capacity in COPD patients. **Lung**. 2014;192: 653–659.
31. LOPES A.J., et al. Relationship between ventilation heterogeneity and exercise intolerance in adults with sickle cell anemia. **Braz J Med Biol Res**. 2017;50. doi:10.1590/1414-431x20176512
32. LUISETTI M., et al. Italian registry of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency: general data and quality of life evaluation. **COPD**. 2015;12 Suppl 1: 52–57.
33. MCDONOUGH J.E., et al. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med**. 2011;365: 1567–1575.
34. MENGA, G. et al. Normativas de diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1 antitripsina. **Revista americana de medicina respiratoria**, v. 14, n. 1, p. 28-46, 2014.
35. MIKAMO M., et al. Predictors of phase III slope of nitrogen single-breath washout in COPD. **Respir Physiol Neurobiol**. 2013;189: 42–46.
36. MILLER M.R., et al. Standardisation of spirometry. **Eur Respir J**. 2005;26: 319–338.
37. MILLIC-EMILI J., TORCHIO R., D'ANGELO E. Closing volume: a reappraisal (1967–2007). **Eur J Appl Physiol**. 2007;99: 567–583.
38. MOLLOY K., et al. Clarification of the risk of chronic obstructive pulmonary disease in α 1-antitrypsin deficiency PiMZ heterozygotes. **Am J Respir Crit Care Med**. 2014;189: 419–427.
39. NEDER J.A., et al. Reference values for lung function tests. I. Static volumes. **Braz J Med Biol Res**. 1999;32: 703–717.
40. O'BRIEN M.E., et al. The Impact of Smoke Exposure on the Clinical Phenotype of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in Ireland: Exploiting a National Registry to Understand a Rare Disease. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**. 2015;12: 2–9.
41. PITULAINEN E., et al. Lung Function and CT Densitometry in Subjects with alpha-1-Antitrypsin Deficiency and Healthy Controls at 35 Years of Age. **COPD**. 2015;12: 162–167.
42. PRISK G.K., et al. Pulmonary gas exchange and its determinants during sustained microgravity on Spacelabs SLS-1 and SLS-2. **J Appl Physiol**. 1995;79: 1290–1298.
43. ROBINSON P.D., et al. Consensus statement for inert gas washout measurement using multiple- and single- breath tests. **Eur Respir J**. 2013;41: 507–522
44. RODRÍGUEZ P., et al. Diagnóstico tardío de déficit de α -1-antitripsina. **An Sist Sanit Navar**. 2011;34.

45. RUSSO R., et al. Prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency and allele frequency in patients with COPD in Brazil. **J Bras Pneumol**. 2016;42: 311–316.
46. SERRA H.G., et al. Avaliação da concentração de alfa 1-antitripsina e da presença dos alelos S e Z em uma população de indivíduos sintomáticos respiratórios crônicos. **J Bras Pneumol**. 2008;34: 1019–1025
47. STRANGE C., et al. The United States Alpha-1 Foundation Research Registry: Genesis, Impact and Future. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**. 2015;12: 42–45.
48. STOCKS J.M., et al. Pharmacokinetic comparability of Prolastin®-C to Prolastin® in alpha₁-antitrypsin deficiency: a randomized study. **BMC Clin Pharmacol**. 2010;10: 13.
49. STOCKLEY R.A. Antitrypsin Deficiency Assessment and Programme for Treatment (ADAPT): The United Kingdom Registry. **COPD**. 2015;12 Suppl 1: 63–68.
50. TECULESCU D.B., et al. Computerized single-breath nitrogen washout: Predicted values in a rural French community. **Lung**. 2004;174.
51. TESCHLER H. Long-term experience in the treatment of α 1-antitrypsin deficiency: 25 years of augmentation therapy. **Eur Respir Rev**. 2015;24: 46–51.
52. USEMANN J., et al. Inert gas washout: background and application in various lung diseases. **Swiss Med Wkly**. 2017;147: w14483.
53. VECCHIOLA C.A., et al. Instilación intratraqueal de elastasa en la rata: Cambios electroforéticos de la α 1-AT-antitripsina en el lavado broncoalveolar. **Revista chilena de enfermedades respiratorias**. 2008;24.
54. VIDAL R., et al . Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina. **Archivos de Bronconeumología**. 2006;42: 645–659.
55. WEWERS M.D., et al. Replacement Therapy for Alpha1-Antitrypsin Deficiency Associated with Emphysema. **N Engl J Med**. 1987;316: 1055–1062.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA

Número e iniciais do(a) Paciente : _____/_____

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: Avaliação dos pacientes com DPOC e mutação do gene SERPINA 1

Coordenadores: Dra. Cláudia Henrique da Costa e Dra. Thaís Ferrari

Endereço: Disciplina de Pneumologia - Boulevard 28 de setembro, 77 – 2º andar – Rio de Janeiro - RJ

Número do telefone: 2587-6357

INTRODUÇÃO E CONVITE PARA PARTICIPAR:

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa. Antes de concordar em participar desta pesquisa, é importante que o Sr.(a) leia e entenda a explicação. Esta declaração descreve o objetivo, as consultas e exames, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados associados com a pesquisa. Ela descreve também o seu direito de sair da pesquisa a qualquer momento do estudo.

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) para participar desta pesquisa para avaliar melhor a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).

A DPOC geralmente é uma doença que ocorre em pessoas que fumam ou inalam partículas ou gases tóxicos que levam a uma inflamação no pulmão. Mas ela pode ocorrer também menos frequentemente em pessoas que tem uma alteração genética. Esses fatores podem causar uma inflamação crônica nos pulmões que podem causar lesões responsáveis pelo aparecimento de sintomas, como falta de ar e tosse.

Os testes de função pulmonar são fundamentais para quantificação da doença. Os métodos são de simples realização e geram informações extremamente relevantes para o melhor entendimento e identificação mais precoce da doença.

O(A) Sr(a) está sendo convidado a participar desta pesquisa porque é acompanhado no ambulatório da Disciplina de Pneumologia, por DPOC podendo ser pelo uso do cigarro ou alteração genética.

OBJETIVO DO ESTUDO

Comparar dados epidemiológicos e funcionais de pacientes com DPOC causada pela deficiência de alfa-1-antitripsina (alteração genética) com pacientes com DPOC devido ao tabagismo.

CONSULTAS E EXAMES DO ESTUDO

Haverá um período de seleção e um período de realização dos exames.

Depois que o Sr.(a) concordar em participar e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, será pedido que o Sr (a) responda a um questionário e serão feitos os seguintes exames:

- Coleta de sangue por gotejamento obtido por uma picadura na região distal de um dos dedos da mão, para dosar a enzima que se encontra alterada se houver alteração genética.
- Coleta de sangue para dosagem de enzimas que avaliam o funcionamento do fígado.
- Prova de função respiratória (espirometria);
- Medida de volumes pulmonares com a técnica de pletismografia
- Medida de volumes pulmonares com a técnica de washout de nitrogênio

Durante o período de seleção de pacientes, o seu médico lhe orientará quanto aos medicamentos que podem ser utilizados.

A Prova de Função Respiratória (espirometria) será feita na Disciplina de Pneumologia, como de costume e faz parte dos exames normalmente solicitados para acompanhamento de pessoas com doenças respiratórias. Durante o exame, o (a) paciente deverá produzir uma expiração forçada (soprar com força). O exame será repetido após o uso de medicamento broncodilatador (que dilata os brônquios) para avaliar se esse medicamento pode lhe ajudar a respirar. A medida de volumes pulmonares com a técnica de pletimografia será feita na Disciplina de Pneumologia, como de costume e faz parte dos exames normalmente solicitados para acompanhamento de pessoas com doenças respiratórias. Nesse exame, você entra em uma cabine e faz algumas manobras respiratórias que serão medidas pelo aparelho.

A medida de volumes pulmonares através da técnica de washout de nitrogênio será feita na Disciplina de Pneumologia, na mesma sala da pletismografia e também é um exame que pode fazer parte daqueles normalmente solicitados para acompanhamento de pessoas com doenças respiratórias. Também é utilizada uma máquina que mede a sua respiração.

A coleta de sangue por gotejamento de picadura de um dos dedos da mão costuma ser solicitado pelo menos uma vez na vida de pacientes que tenham Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. E o desconforto é semelhante a picadura de dedo realizado por exame de HGT (que mede usualmente a glicose). E a coleta de sangue por veia periférica (exame de sangue usual) costuma ser solicitado de rotina junto com outros exames laboratoriais para avaliação e acompanhamento da função hepática (do fígado).

SUAS RESPONSABILIDADES

- O (A) Sr(a) deverá vir realizar todos os exames programados;
- O (A) Sr(a) deverá informar ao médico do estudo sobre qualquer medicamento que esteja tomando;

RISCOS RELACIONADOS AO ESTUDO

Os exames realizados nesse estudo não causam danos para a sua saúde. A coleta de sangue pode deixar uma marca roxa no local de punção que sairá em poucos dias. Os exames de função pulmonar podem ser cansativos para alguns pacientes.

BENEFÍCIOS

Além de obter maior informação quanto ao seu estado de saúde e de poder contribuir para que os médicos possam estudar e compreender melhor a sua doença, a DPOC, o (a) Sr (a) não obterá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa.

RESSARCIMENTO DE DESPESAS

Não haverá nenhum tipo de compensação financeira para os participantes da pesquisa. Por outro lado, os exames serão feitos no Hospital Universitário Pedro Ernesto e não serão cobrados.

CONFIDENCIALIDADE

Seu médico do estudo irá coletar informações a seu respeito. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial e serão usados para a avaliação do estudo. Os dados podem ser submetidos às autoridades de saúde, do Comitê de Ética em Pesquisa ou outras pessoas exigidas por lei podem revisar os dados fornecidos. Estes dados também podem ser usados em publicações médicas sobre os resultados do estudo. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer relatório do estudo ou publicações médicas.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA / RETIRADA

Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Cabe ao(à) Sr(a) decidir se quer participar ou não. Mesmo se decidir participar, o(a) Sr(a) é livre para desistir do estudo a qualquer momento sem dar um motivo ou explicação. Isto não afetará seu cuidado médico futuro de qualquer forma.

ANUÊNCIA PARA FAZER PARTE DO ESTUDO

Assinando este documento você concorda que:

- Você teve chance para fazer perguntas.
- Você é voluntário(a) para participar deste estudo.

EU CONCORDO LIVREMENTE EM PARTICIPAR DESTES ESTUDO

Assinatura do Paciente

Data (dd/mm/aa)

Nome por escrito do Paciente

Assinatura de Pessoa que Explicou o Consentimento

Data (dd/mm/aa)

Nome e título da Pessoa que Explicou o Consentimento

APÊNDICE B – Artigo submetido

Evaluation of the small airways in patients with chronic obstructive pulmonary disease and alpha-1 antitrypsin deficiency

Authors:

Thais Ferrari da Cruz – State University of Rio de Janeiro

thais.ferrari2110@gmail.com

Cláudia Henrique Costa - State University of Rio de Janeiro

ccosta.uerj@gmail.com

Rogério Rufino - State University of Rio de Janeiro

rrufino.uerj@gmail.com

Agnaldo José Lopes - State University of Rio de Janeiro

agnaldolopes.uerj@gmail.com

Arnaldo Noronha - State University of Rio de Janeiro

arjonofi@gmail.com

Postal address: Av João Gualberto, 253 ap 241 80030-000 Curitiba-PR Brazil.

Phone number: +55(41)99911-4487

Email address: thais.ferrari2110@gmail.com

Abstract

INTRODUCTION: The small airways as those with an internal diameter less than 2 mm are not evaluated with traditional pulmonary function tests. Therefore, interest has recently increased for test such as nitrogen washout. **OBJECTIVE:** to evaluate the small airways in patients with COPD during the stable phase of the disease with a nitrogen washout test and to verify whether there is a difference between patients with COPD due to smoking and those with COPD due to alpha-1 antitrypsin deficiency. **METHODS:** This was an observational cross-sectional study evaluating the small airways of patients diagnosed with COPD. **RESULTS:** Of the 299 patients contacted, were included 16 with some type of mutation of SERPINA1 (serine protease inhibitor 1) and 45 with no mutation. We did not observe a significant difference between FEV1/FVC, FEV1%, FVC%, static lung volumes and diffusion capacity to carbon monoxide. When analyzing patients with smoking COPD (n = 45) and COPD patients with severe mutations (n = 5) there was a significant difference in closure volume (%). In the group of patients with COPD (n = 45) and mutation of the alpha-1 antitrypsin gene (n = 16) (p = 0.014), there was an inverse relationship between smoking and closure volume (%). We also verified that both the phase III slope (%) and ΔN_2 75–1250ml (%) could be used to differentiate the severity of airflow limitation similar to FEV1. **CONCLUSION:** The nitrogen washout test was easily achievable in most patients with COPD. Moreover, both the phase III slope and the ΔN_2 750–1250mL (%) were related to COPD severity. Further studies are needed to determine the role of nitrogen washout variables, particularly closure volume, in the study of small airways of patients with COPD caused by smoking and by mutation of the *SERPINA1* gene.

Key words: Serine Proteinase Inhibitors; Pulmonary Disease, Chronic Obstructive, Alpha-1 Protease Inhibitor Deficiency; Respiratory Function Tests.

1. Introduction

Small airways, defined as those with an internal diameter less than 2 mm, are not evaluated with traditional pulmonary function tests. Therefore, interest has recently increased for tests such as nitrogen washout, which can be used for such evaluations [1]. The nitrogen washout test was first described more than 60 years ago. However, with the modernization of pulmonary function tests, greater availability of equipment, commercialization, and increasing interest in the evaluation of small airways, the examination has re-emerged as an important tool to evaluate patients with pulmonary diseases, particularly as it offers a non-invasive and fast-performing test [2-4].

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with high morbidity and mortality, leading to a significant worsening in the quality of life of affected individuals. Therefore, COPD is a major public health concern in Brazil and worldwide [1]. It is a heterogeneous disease, caused by both genetic alterations and exposure to noxious gases [4]. It becomes a more serious problem when it presents with early onset, as occurs in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency [5]. Regardless of the triggering risk factor, COPD is believed to start in the small airways before symptoms manifest. For this reason, this region is called the silent zone of the lung [4,6]. Local inflammation begins, with epithelial destruction, accumulation of mucus, and remodeling of the airways [4].

The small airways do not contain cartilage in their walls, which accounts for most of the obstruction related to COPD [6,7]. They are a region of low resistance, contributing just 10% of the resistance of the airways. Therefore, when local obstruction occurs, the resistance increases little and has little repercussion on the respiratory mechanisms. However, there is a large change in ventilation distribution, and this repercussion cannot be evaluated with

traditional function tests such as spirometry, full body plethysmography, or diffusion [4]. The single-breath maneuver in the nitrogen washout test has been the most used as it is quicker and easier to complete compared with the multiple breathing maneuver [3]. As described by Deus et al. [2], increases in the phase III slope and the ratio of closure volume to vital capacity (CV/VC) indicate heterogeneity of ventilation distribution and small airway disease, respectively. Recent studies have shown that the phase III slope provides a highly sensitive evaluation of pathology in the small airways, identifying changes when other pulmonary function tests would not [4]. In addition, alterations of the phase III slope and closure volume (CV) ratio can demonstrate heterogeneity in the distribution of small airway ventilation. We have also been able to relate an increase in the phase III slope with clinical symptoms, such as worsening dyspnea and decreased exercise tolerance [1].

In this study, we aimed to evaluate the small airways in patients with COPD during the stable phase of the disease with a nitrogen washout test and to verify whether there is a difference between patients with COPD due to smoking and those with COPD due to alpha-1 antitrypsin deficiency.

2. Methods

2.1. Study design

We conducted an observational cross-sectional study evaluating the small airways of patients with stable COPD. Data were collected in the city of Rio de Janeiro from October 2016 to October 2017. The patients were initially contacted by telephone and scheduled for a face-to-face assessment to verify the selection criteria and to perform the study procedures.

2.2. Participants

The inclusion criteria were as follows: (i) patients older than 18 years of age; (ii) visiting the pulmonology outpatient clinic of Pedro Ernesto Hospital (Rio de Janeiro State University); (iii) diagnosed with COPD according to the criteria of the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD); and (iv) presenting compatible clinical characteristics and spirometry with FEV1/ FVC ratio (forced expiratory volume in the first second/forced vital capacity) post-bronchodilator <0.7 [8]. Moreover, patients should have >10 pack years and/or a mutation of the *SERPINA1* (serin protease inhibitor 1) gene as the cause of COPD.

Exclusion criteria were as follows: (i) diagnosis of lung diseases from other causes (e.g., pulmonary fibrosis, tuberculosis sequel); (ii) exacerbation of lung disease in the previous three months; (iii) infectious diseases of any nature in the previous three weeks; (iv) history of asthma, rhinitis or respiratory allergy; (v) patients who have previously undergone thoracic surgery; (vi) pregnant women; (vii) patients previously transplanted; or presenting a history of inability to perform respiratory function tests.

2.3. Study procedure

Data collected included age, sex, body mass index, occupational history, smoking history, and home oxygen use. All pulmonary function tests were performed even if the patient had a recent spirometric examination to ensure that the tests were performed by the same person and using the same device. Spirometry and volume and diffusion capacity measurements were performed on HD CPL equipment (nSpire Health Inc., Longmont, CO, USA) and followed the standardization and interpretation of the American Thoracic Society, 2005 [9]. We adopted equations by Knudson et al. [10] and Neder et al. [11].

The nitrogen washout test was performed with the HD PFR 3000 apparatus (nSpireHealth, Inc., Longmont, CO, USA). The single-breath maneuver washout was

performed according to the recommendations of the American Thoracic Society/European Respiratory Society [12]. In the single-breath nitrogen washout technique, the patient begins to exhale all air to their residual volume and then slowly inhales 100% oxygen to their full lung capacity. Then the patient continues to perform a full expiration and, at that moment, the device records a vertical curve quantifying the exhaled nitrogen [6]. In healthy individuals who undergo a washout test, after phase III, which represents the expiration of the alveolar air, the small airways are closed and phase IV begins. The closure is progressive and ascending, and it is represented by the nitrogen expiration curve that progressively rises to reach the closure of the pulmonary apices where the nitrogen is more concentrated [6].

We evaluated the ΔN_2 750–1250 ml (%) (the change in percentage of exhaled nitrogen between the 750 and 1250 mL portion of single breath nitrogen washout), phase III slope, and the closure volume. We used the equations of Teculescu et al. [13] to standardize values for the phase III slope and CV for the anthropometric data of the patients. The alpha-1-antitrypsin dosage was also assessed with immunonephelometry on filter paper, and blood was collected by dripping blood obtained from the distal region of one of the fingers of the hand onto filter paper. In patients with low levels, i.e., less than 2.64 mg/dL, the presence of a mutation was confirmed with molecular study of the *SERPINA1* gene or by genetic sequencing, as required. These processes were conducted in the Laboratory Medicina Afip. This procedure has been performed routinely in the COPD clinic for all patients and was performed specifically for the study when the patient did not have a diagnosis reported in their medical record.

The classification of the severity of airflow limitation in COPD was based on the criteria presented in the GOLD 2018 [8]. The value of FEV₁ (forced expiratory volume in the first second) was used post-bronchodilator during spirometry to classify severity as follows: mild, FEV₁ \geq 80%; moderate, FEV₁ $<$ 80% and \geq 50%; severe, FEV₁ $<$ 50% and \geq 30%; and very severe, FEV₁ $<$ 30% [8].

2.4. Statistical analysis

For quantitative variables, we present the mean, median, minimum value, maximum value, first and third quartiles, and standard deviation. Meanwhile, qualitative variables are presented as frequencies and percentages. For comparison of the groups in relation to quantitative variables, we conducted student's t-tests for independent variables and non-parametric Mann-Whitney samples. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare COPD classifications in relation to the nitrogen washout variables and, when necessary, the covariance analysis model was adjusted with pack years as a covariate. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Data were analyzed with IBM SPSS Statistics v.20.0 software (Armonk, NY: IBM Corp.).

2.5 Ethical considerations

This project was approved by the research ethics committee of the Pedro Ernesto University Hospital and all patients provided informed consent before carrying out any study procedure.

3. Results

Telephone contact was randomly attempted with 582 patients being followed up at the COPD clinic of the State University of Rio de Janeiro. Of the 299 patients successfully contacted, 147 appeared to be eligible to participate in the study and were invited to attend the institution. Of these, 75 attended on the date scheduled to be assessed.

The inclusion and exclusion criteria were applied to the 75 patients and it was verified that 12 were not able to participate in the study at that time due to current or recent exacerbations and 2 presented difficulties in performing the requested maneuvers.

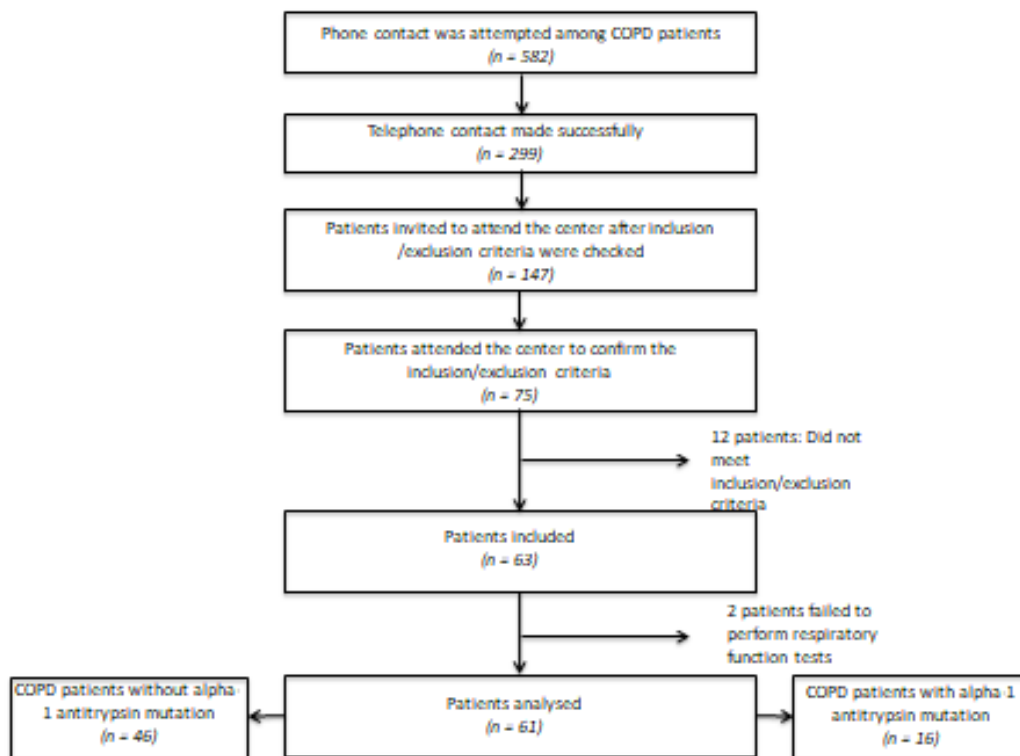
Of the 299 patients contacted, 46 had some mutation of *SERPINA1* (serine protease inhibitor 1) and 16 were included in the study. Table 1 presents the genotypes included in the study. Of the 16 patients with some type of mutation, 5 had severe mutations. Therefore, after including 61 patients, we observed that 45 had no *SERPINA1* mutation and 16 did have a mutation with 5 having severe mutations. Below the flowchart with patient recruitment (Figure 1).

TABLE 1: Variations of mutations of the *SERPINA1* gene of patients included in the study.

Gene mutation variations of <i>SERPINA1</i>	Number of patients
PiMS	8
PiMZ	3
PiZZ	4
PiNull	1

Legend: SERPINA: serine protease inhibitor; Pi: protease inhibitor; Null: null mutation, which is characterized by the absence of production of any amount of alpha-1-antitrypsin.

Figure 1: Recruitment flowchart



Among the 61 participants, 33 were women and the mean age was 65.5 (SD 7.61) years. When dividing the participants into two groups (with and without mutation of the *SERPINA1* gene), we did not observe a significant difference between FEV1/FVC, FEV1% (forced expiratory volume in the first second percentage of predicted), FVC% (forced vital capacity percentage of predicted), TLC% (total lung capacity percentage of predicted), RV% (residual volume percentage of predicted), RV/TLC%, DLCO% (diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide percentage of predicted) and KCO% (Krogh's constant, the value

calculated from DLCO/VA: diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide/alveolar volume). Moreover, static lung volumes and diffusion capacity to carbon monoxide were also similar in both groups. However, there was a statistically significant difference in the smoking load between the two groups, with a mean in the gene mutation group of 28.06 + 25.10 m/a and a mean in patients with exclusively smoking COPD of 75.57 + 56.11 m/a (Table 2).

Table 2: Evaluation of clinical and functional differences between groups of patients with COPD with and without mutation of the alpha-1 antitrypsin gene

Variable	Mutation	N	Average	Standard deviation	P value
Age (years)	With	16	65.56	7.55	0.586*
	Without	45	66.78	7.65	
Packs/year	With	16	28.06	25.10	0.001**
	Without	44	75.57	56.11	
FEV1/FVC	With	16	50.96	12.43	0.412*
	Without	45	53.55	10.14	
FEV1%	With	16	56.81	21.49	0.486**
	Without	45	61.71	19.09	
FVC%	With	16	86.31	16.64	0.408**
	Without	45	91.60	19.58	
TLC%	With	14	124.86	31.75	0.670**
	Without	42	122.57	46.02	
RV%	With	14	179.07	72.39	0.264**
	Without	42	166.90	109.00	
RV/TLC%	With	14	140.79	33.22	0.272**
	Without	42	131.71	26.42	
DLCO%	With	15	85.53	30.29	0.141*
	Without	45	72.76	18.65	
KCO%	With	16	96.63	19.95	0.235*
	Without	45	88.56	24.09	

Legend: FEV1/FVC: forced expiratory volume in the first second/forced vital capacity. FEV1%: forced expiratory volume in the first second percentage of predicted. FVC%: forced vital capacity percentage of predicted. TLC%: Total Lung Capacity percentage of predicted. RV%: Residual volume percentage of predicted. DLCO%: diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide percentage of predicted. KCO%: Krogh's constant the value calculated from DLCO/VA (diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide/alveolar volume).

We did not observe any statistically significant differences in ΔN_2 750–1250ml (%), phase III slope (%), or closure volume (%) between the groups with ($n = 16$) and without ($n = 45$) mutation of the *SERPINA1*, even controlling for the effects of smoking.

The same analyses were performed comparing patients with COPD ($n = 45$) and patients with COPD and severe mutations ($n = 5$). Similarly, there were no significant differences between the groups in phase III slope (%) or ΔN_2 750–1250ml (%). However, there was a significant difference between the two groups in closure volume (%) ($p < 0,003$). Airflow obstruction (FEV1) was analyzed and there was no difference in the severity of COPD between the two groups.

We also assessed whether the main variables of the nitrogen washout test could be used to classify the severity of COPD, as is done with spirometry, by categorizing airflow limitation as mild, moderate, severe, and very severe. As the number of patients in the very severe group was small, we decided to consider the severe and very severe patients in the same group. We verified that both the phase III slope (%) and ΔN_2 75–1250ml (%) could be used to differentiate the severity of airflow limitation similar to FEV1. The phase III slope could be used to differentiate groups of patients classified as mild COPD from those with moderate COPD, and also differentiated groups of mild COPD from those with severe/very severe COPD (Figure 2). The variable ΔN_2 750–1250ml (%) could be used to differentiate the mild COPD group from the severe/very severe group (Figure 3).

Figure 2: Ability of the phase III slope to predict differences in severity between those with mild, moderate, and severe/very severe COPD.

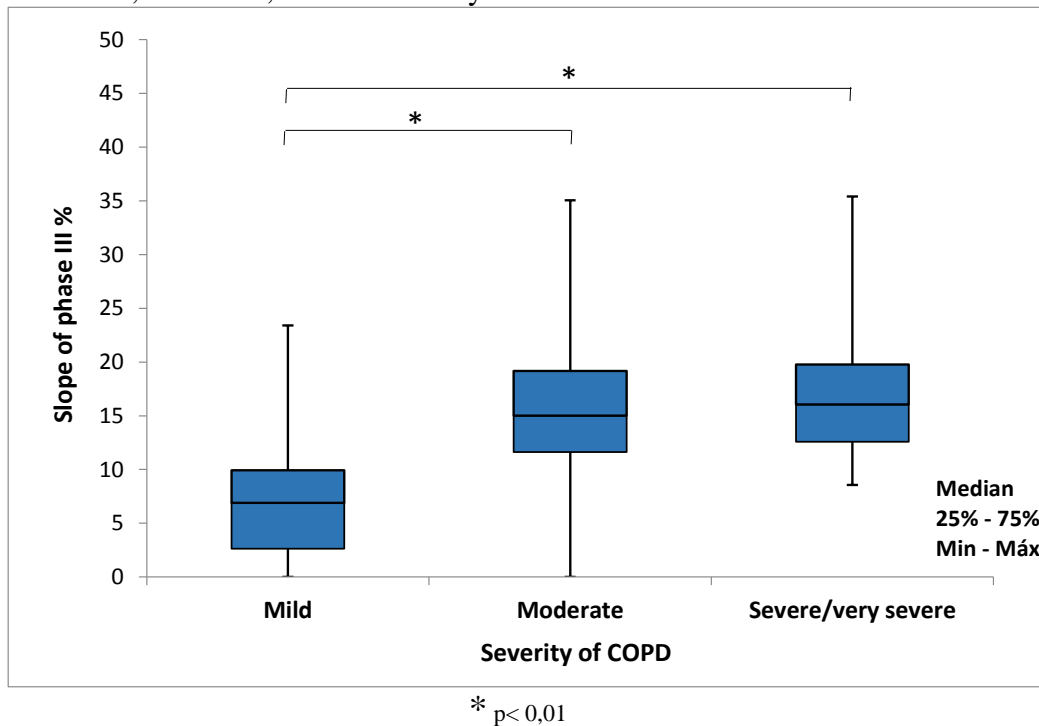
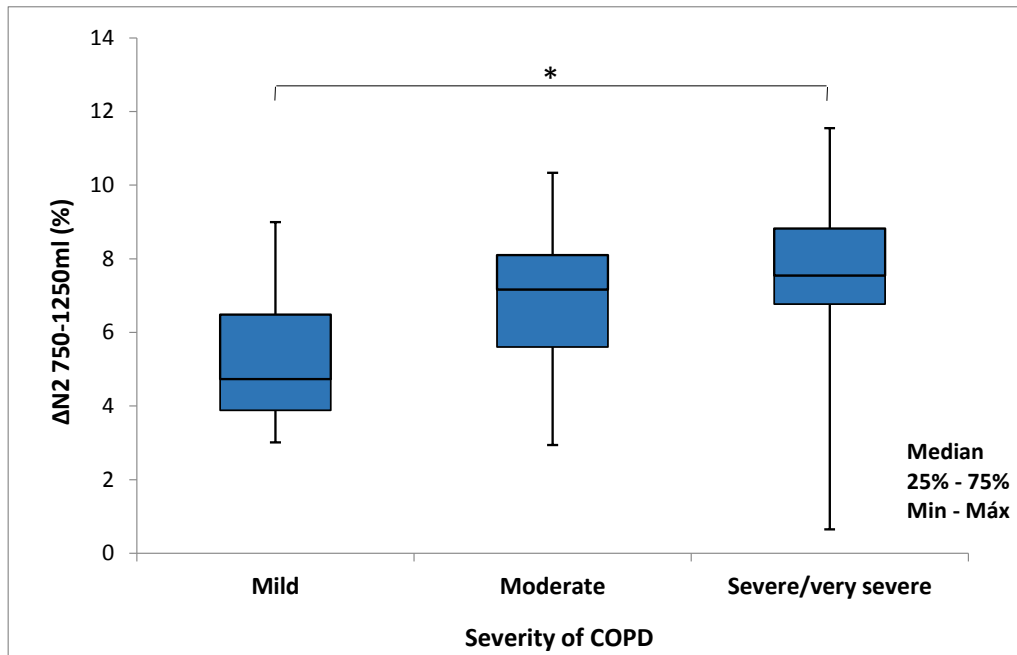


Figure 3: Ability of ΔN_2 750–1250ml (%) to predict differences in severity between those with mild and moderate COPD.



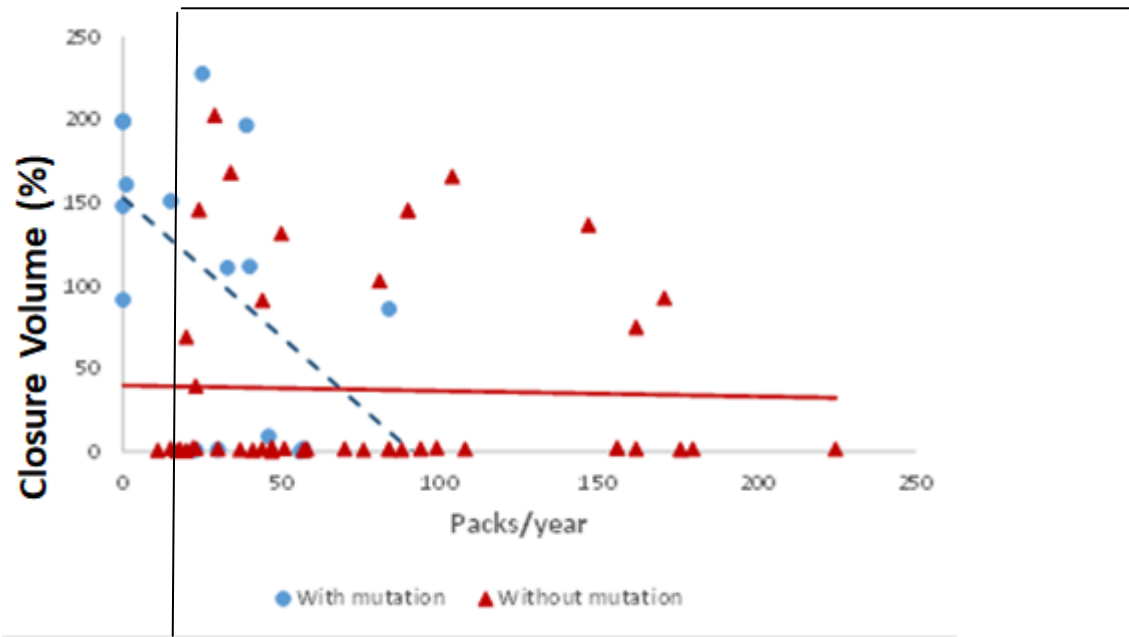
* $p < 0,01$

Relating the smoking load to the closure volume (%), we observed an inverse relationship in patients with COPD and a mutation of the alpha-1 antitrypsin gene ($p = 0.014$) (Figure 4). We estimated that for each unit increase in the number of packs/year there is a decrease of 1.68 units in CV (%) (Table 3).

Table 3: Relationship between closure volume (%) and smoking load in patients with and without alpha-1 antitrypsin mutation.

Number of packs/year	With mutation	Without mutation	P value
5	144.64	39.69	<0.001
10	136.24	39.52	<0.001
15	127.84	39.36	<0.001
20	119.45	39.19	0.001
25	111.05	39.03	0.001
30	102.65	38.86	0.003
40	85.85	38.53	0.032
60	52.26	37.87	0.616

Figure 4: Inverse relationship between number of packs/year and closure volume (%) in patients with a mutation of the alpha-1 antitrypsin deficiency gene.



Coefficient of determination (R^2) = 22.2%

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to evaluate the small airways and the distribution of ventilation with the nitrogen washout test in patients with COPD with and without the alpha-1 antitrypsin gene mutation.

Although small airways are of major clinical importance, most previous studies have focused predominantly on the early detection of small airway disease due to inhalation of cigarette smoke [14]. However, it is important to emphasize that emphysema, from any cause, increases air space and decreases communication with alveolar spaces and small airways. This impairs microvascular perfusion and leads to poor ventilation distribution. However, this important repercussion in the distribution of ventilation cannot be evaluated with traditional pulmonary function tests [15,16].

Various studies have reported that the nitrogen washout test can differentiate groups of patients according to the severity of COPD previously evaluated with FEV1. This was confirmed by the results of our study. However, our data somewhat form that previously reported. For example, Katsoulis et al. [6] report that an increase in closure capacity and closure volume, as well as the phase III slope, correlates with the severity of airflow limitation in patients with COPD. In our study, the phase III slope was related to severity of COPD, and could differentiate between patients with mild and moderate COPD, and between those with mild and very severe COPD. Moreover, ΔN_2 750–1250ml (%) values could be used to differentiate between patients with differing COPD severity, differentiating patients with mild COPD from those with severe/very severe COPD. However, our results suggest that closure volume (%) is not useful in differentiating patients with COPD according to severity. Similar to our study, Boek et al. [4] reported that the phase III slope is related to COPD severity, but emphasized that FEV1 remains the best predictor of disease severity. The authors also compared the phase III slope with the severity of dyspnea measured with the MmRC scale, desaturation or the 6-minute walk test.

Another interesting finding of our work was the inversely proportional correlation between number of packs year and CV in patients with a mutation of the alpha-1 antitrypsin

gene ($n = 16$). This is opposite to what was expected because, as reported in the literature, closure volume (phase IV) is increased in patients with smoking COPD [6]. In practice, CV is used to measure the difference in volume from the closure of the small airways to the residual volume [17]. To explain the tracing of the closure volume obtained under normal conditions, a simple model was proposed based on the assumption that the intrinsic properties of the lungs are uniform, that there is a single closing pressure of the airways, and that changes in pleural pressure are the same in all regions of the lung. Although these criteria are not met, even in lungs considered normal, they make it possible to understand the mechanisms involved in the generation of closure volume traces [17].

Isolated segments of the lungs expand evenly but, within the chest, this behavior is different, mainly due to the fact that the pleural pressure in the intact chest has a vertical gradient with more negative values in the upper portions. Accordingly, the transpulmonary pressure is higher in the upper zones and the upper units expand more than do the lower ones [17]. A previous study evaluated the effects of gravity on lung perfusion heterogeneity in humans in the absence of it during the Spacelab Life Science mission [18]. A significant decrease in phase VI elevation was demonstrated when assessments were performed without gravity, confirming that airway closure occurs first in gravity-dependent lung regions (bases), and that the phase IV slope curve is strongly related to the topography of ventilation heterogeneity [18]. In other words, if the difference between apex and base tends to equalize, the elevation of the phase IV curve tends to flatten.

Nitrogen washout depends on differences in nitrogen concentration in each lung region and is determined by differences in mechanical properties in different regions of the airways. In a healthy individual, phases III and IV can be accurately defined. Under these conditions, the phase III slope remains constant and the last point before the abrupt increase in the curve, and the nitrogen concentration represents the beginning of phase IV. In patients with lung disease, the phase III slope progressively increases with disease severity reflecting uneven dilution of alveolar gas and the variation between phases III and IV may become less evident as the disease progresses. In patients with more severe disease, such a significant increase in the phase III slope may make it difficult to identify the beginning of phase IV [19].

In our opinion, data showing an inversely proportional relationship between smoking and CV values in patients with the *SERPINA1* gene mutation could be explained in two ways. First, we suggest that patients with progressively higher alpha-1 antitrypsin deficiency with a smoking load would have progressively more severe COPD. Moreover, if these patients have a very large elevation in the phase III slope that makes it difficult to identify the starting point of phase IV, this would lead to a phase IV that is proportionally and disguisedly flattened, and with smaller values. This proportional increase in the phase III slope in relation to the reduction in CV was tested in this study but cannot be supported by the data. A proportional reduction in FEV1 was also not demonstrated in this study.

Second, based on Lapperre's observation that alterations in the topographic distribution of ventilation would alter the results of the nitrogen washout test [20], we propose that emphysema would predominate in apices (related to inhale particles) in patients with smoking COPD. In contrast, patients with alpha-1 antitrypsin mutation/deficiency emphysema would be predominantly basal, while patients with a mutation in alpha-1 antitrypsin and smokers would tend to have diffuse emphysema. Therefore, variations in pleural and transpulmonary pressure distribution alter the elevation of the phase IV curve. Furthermore, pressure differences in the pulmonary topographic regions, when more pronounced, would lead to an increase in the phase IV curve value, and greater homogeneity between apex and base pressures would lead to a less pronounced increase in the phase IV curve. A patient with COPD predominantly at apices would have increased phase IV values due to a significant difference in the involvement between the preserved base and the diseased

apex. In contrast, diffuse disease would tend to decrease the phase IV curve by tending to equalize the differences between apices and bases, since both would be diseased. Thus, we suggest that CV could predict a difference in the anatomical location of lung lesions. A greater value would indicate a more pronounced involvement of the upper airways, while an altered but less pronounced value would indicate more diffuse involvement and pulmonary bases.

Our study also demonstrated a significant difference in closure volume (%) between the groups without mutation and those with severe mutation of the alpha-1 antitrypsin gene. At first it was thought that this difference could be justified by a difference in severity between the two groups, but FEV1 of the two groups was similar. Moreover, we did not observe a difference between the groups in variables for slope phase III and ΔN_2 750–1250 ml (%). Thus, our results suggest that closure volume (%) was more a sensitive indicator of differences between groups with COPD associated with alpha-1 antitrypsin deficiency and those with strictly smoking COPD.

Our study is subject to some limitations, which should be borne in mind when considering the results. It should be noted that the groups had different numbers of participants, the group with COPD exclusively due to smoking containing 45 individuals and the group with COPD with a mutation of alpha-1 antitrypsin deficiency (a rare mutation) containing just 16 individuals. Clinical and functional characteristics were similar, except for smoking, which was significantly lower in patients with the mutation. Of the 16 patients with a mutation of the alpha-1 antitrypsin gene, 11 had a history of previous smoking despite having a lower smoking burden. This fact corroborates the recent recommendations of WHO and ATS/ERS, which suggest a dose of alpha-1 antitrypsin at least once in all patients diagnosed with COPD to facilitate the recognition and orientation of these individuals [21].

A further limitation is that when patients were divided into subgroups according to the severity of the disease, the resulting subgroups had small numbers of individuals. This may have contributed to the fact that we observe positive correlations of COPD severity only in few subgroups severity (order before by FEV1 of spirometry) with ΔN_2 750–1250 ml (%) or phase III slope. We encountered similar difficulties to those reported by authors such as Mikano et al. [3] who emphasized that although evaluation with the single-breath maneuver of the nitrogen washout test is easy to perform in schoolchildren and adults, patients with severe COPD may present difficulties. In our experience, patients with very severe COPD, who have greater difficulties in performing the required maneuvers in respiratory function tests, also have more difficulty getting to the study center, which makes it difficult to include this group of patients in research.

5. Conclusion

Although there is no doubt of the importance of small airways in the genesis and development of pulmonary diseases in general, many questions remain outstanding regarding their precise role and the best way to assess this lung region. The nitrogen washout test was easily achievable in most patients with COPD. Moreover, both the phase III slope and the ΔN_2 750–1250 mL (%) were related to COPD severity. Further studies are needed to determine the role of nitrogen washout variables, particularly closure volume, in the study of small airways of patients with COPD caused by smoking and by mutation of the *SERPINA1* gene.

REFERENCES

1. Lopes AJ, Marinho CL, Alves UD, Gonçalves CEA, Silva PO, Botelho EC, et al. Relationship between ventilation heterogeneity and exercise intolerance in adults with sickle

- cell anemia. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2017;50(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20176512>
2. Deus CAL, Vigário PS, Guimarães FS, Lopes AJ. Nitrogen single-breath washout test for evaluating exercise tolerance and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2018;51(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20177059>
 3. Mikamo M, Shirai T, Mori K, Shishido Y, Akita T, Morita S, et al. Predictors of phase III slope of nitrogen single-breath washout in COPD. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013 Oct 1;189(1):42–6.
 4. Boeck L, Gensmer A, Nyilas S, Stieltjes B, Re TJ, Tamm M, et al. Single-Breath Washout Tests to Assess Small Airway Disease in COPD. *Chest*. 2016;150(5):1091–100.
 5. Camelier AA, Winter DH, Jardim JR, Barboza CEG, Cukier A, Miravittles M. Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento. *J Bras Pneumol*. 2008;34(7):514–27.
 6. Konstantinos Katsoulis K, Kostikas K, Kontakiotis T. Techniques for assessing small airways function: Possible applications in asthma and COPD. *Respir Med*. 2016 Oct;119:e2–9.
 7. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, et al. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2011 Oct 27;365(17):1567–75.
 8. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Copd: Full Repo 2017. 2016. 140 p.
 9. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005 Aug;26(2):319–38.
 10. Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis*. 1983 Jun;127(6):725–34.
 11. Neder JA, Andreoni S, Castelo-Filho A, Nery LE. Reference values for lung function tests. I. Static volumes. *Braz J Med Biol Res*. 1999 Jun;32(6):703–17.
 12. Robinson PD, Latzin P, Verbanck S, Hall GL, Horsley A, Gappa M, et al. Consensus statement for inert gas washout measurement using multiple- and single- breath tests. *Eur Respir J*. 2013 Mar;41(3):507–22.
 13. Teculescu DB, -C. Daniel M, Costantino E, Buhler O, Bohadana AB, Marchand M, et al. Computerized single-breath nitrogen washout: Predicted values in a rural French community. *Lung* [Internet]. 2004;174(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00167950>
 14. Milic-Emili J, Torchio R, D'Angelo E. Closing volume: a reappraisal (1967–2007). *Eur J Appl Physiol*. 2007;99(6):567–83.
 15. Boeck L, Gensmer A, Nyilas S, Stieltjes B, Re TJ, Tamm M, et al. Single-Breath Washout Tests to Assess Small Airway Disease in COPD. *Chest*. 2016;150(5):1091–100.

16. Deus CAL, Vigário PS, Guimarães FS, Lopes AJ. Nitrogen single-breath washout test for evaluating exercise tolerance and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2018;51(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20177059>
17. Milic-Emili J, Torchio R, D'Angelo E. Closing volume: a reappraisal (1967–2007). *Eur J Appl Physiol*. 2007;99(6):567–83.
18. Prisk GK, Elliott AR, Guy HJ, Kosonen JM, West JB. Pulmonary gas exchange and its determinants during sustained microgravity on Spacelabs SLS-1 and SLS-2. *J Appl Physiol*. 1995;79(4):1290–8.
19. Barbini P. A Functional Mathematical Model to Simulate the Single-Breath Nitrogen Washout. *Open Biomed Eng J*. 2013;7(1):81–92.
20. Lapperre TS, Willems LNA, Timens W, Rabe KF, Hiemstra PS, Postma DS, et al. Small airways dysfunction and neutrophilic inflammation in bronchial biopsies and BAL in COPD. *Chest*. 2007 Jan;131(1):53–9.
21. American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 1;168(7):818–900.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação dos pacientes com DPOC e mutação do gene SERPINA 1

Pesquisador: Thaís Ferrari da Cruz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55174616.3.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.814.020

Apresentação do Projeto:

Continuação do Parecer: 1.517.632

Objetivo da Pesquisa:

Continuação do Parecer: 1.517.632

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Continuação do Parecer: 1.517.632

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Continuação do Parecer: 1.517.632

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos dados necessários para apreciação ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram atendidas as considerações do Parecer anterior. O projeto pode ser realizado da fora como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO. Para ter acesso ao PARECER CONSUBSTANCIADO: Clicar na "LUPA" (DETALHAR) - Ir em "DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA", clicar na opção da ramificação (pequeno triângulo no entroncamento do organograma) de pastas chamada

Continuação do Parecer: 1.814.020

"Apreciação", e depois na Pasta chamada "Pareceres", o Parecer estará nesse local.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Instituição
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_667641.pdf	02/11/2016 13:56:01		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Mestrado.doc	07/03/2016 21:24:48	Thaís Ferrari da Cruz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.doc	07/03/2016 21:23:52	Thaís Ferrari da Cruz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_de_ciencia_Thais_Ferrari.pdf	07/03/2016 21:23:29	Thaís Ferrari da Cruz	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rostro_Thais_Ferrari.pdf	07/03/2016 21:20:11	Thaís Ferrari da Cruz	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

RIO DE JANEIRO, 09 de novembro de 2016

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador)

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo










16/10/2018

Hindawi Manuscript Tracking System



Hindawi

5049593.v1 (Research Article)

Title	 Evaluation of the small airways in patients with chronic obstructive pulmonary disease and alpha-1 antitrypsin deficiency
Journal	Pulmonary Medicine
Issue	New Insights into Small Airways Diseases (NISAD)
Additional Files	 Cover Letter
Manuscript Number	5049593 (Research Article)
Submitted On	2018-08-17
Author(s)	 Thais da Cruz ,  Cláudia Costa,  Rogério Rufino,  Agnaldo Lopes,  Arnaldo Noronha
Editor	  Charles Downs
Status	Under Review