



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Presidente Prudente

FERNANDA MARIA MACHADO RODRIGUES



**TABAGISMO E MECANISMOS DE DEFESA: RESPOSTA IMUNE E
TRANSPORTE MUCOCILIAR**

**PRESIDENTE PRUDENTE
2012**

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Seção de Pós-Graduação
Rua Roberto Simonsen, 305 CEP 19060-900 Presidente Prudente SP
Tel 18 229-5352 fax 18 223-4519 posgrad@prudente.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Presidente Prudente

FERNANDA MARIA MACHADO RODRIGUES

**TABAGISMO E MECANISMOS DE DEFESA: RESPOSTA IMUNE E
TRANSPORTE MUCOCILIAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de Mestre no programa de Pós-graduação em Fisioterapia.

Orientadora: Prof^aDr^a Ercy Mara Cipulo Ramos

**PRESIDENTE PRUDENTE
2012**

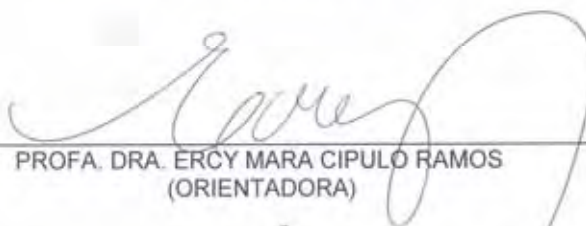
FICHA CATALOGRÁFICA

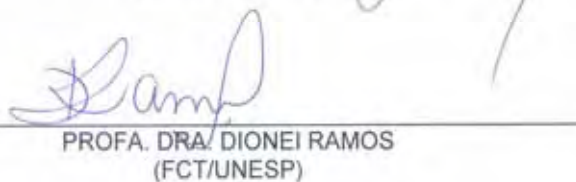
R613t Rodrigues, Fernanda Maria Machado.
Tabagismo e mecanismos de defesa : resposta imune e transporte mucociliar / Fernanda Maria Machado Rodrigues. - Presidente Prudente: [s.n], 2012
108 f

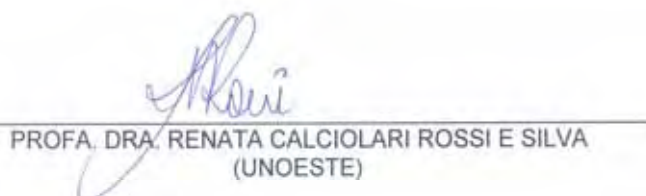
Orientador: Ercy Mara Cipulo Ramos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Inclui bibliografia

1. Tabagismo. 2. Marcadores inflamatórios. 3. Transporte mucociliar. I. Ramos, Ercy Mara Cipulo. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Tabagismo e mecanismos de defesa : resposta imune e transporte mucociliar.

BANCA EXAMINADORA


PROFA. DRA. ERCY MARA CIPULO RAMOS
(ORIENTADORA)


PROFA. DRA. DIONEI RAMOS
(FCT/UNESP)


PROFA. DRA. RENATA CALCIOLARI ROSSI E SILVA
(UNOESTE)


FERNANDA MARIA MACHADO RODRIGUES

PRESIDENTE PRUDENTE (SP), 15 DE DEZEMBRO DE 2012.

RESULTADO: Aprovado

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos, que compartilharam este sonho comigo e nunca mediram esforços ao me fornecer todo o apoio necessário para a sua concretização.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por derramar tantas bênçãos e enviar tantas pessoas especiais em minha caminhada. Seu cuidado constante foi imprescindível para a finalização deste propósito. Obrigada, Senhor, por mais esta Graça recebida de Ti.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ercy Mara Cipulo Ramos. Sua competência, humanismo e dedicação em prol do desenvolvimento da pesquisa científica, assim como sua forma de orientação são inspiradores. Sinto-me privilegiada por termos convivido todos esses anos que me proporcionaram intensos aprendizados e amadurecimento científicos. Muito obrigada por me ter feito acreditar que seria possível e por participar tão ativamente para que isso realmente acontecesse.

À Prof^a Dr^a Dionei Ramos, que esteve presente ao longo desta caminhada, sempre disposta a ajudar no que fosse necessário. Muito obrigada por toda atenção e carinho depositados em mim nesses anos de convivência.

Às Professoras Dr^a Alessandra Choqueta de Toledo e Flávia Alessandra Guarnier, muito obrigada pelas valiosas contribuições científicas, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Renata Calciolari Rossi e Silva, pela sensibilidade e disposição em contribuir ativamente neste momento tão importante.

Às agências financiadoras FAPESP, CNPq e PROEX pelo apoio financeiro que muito contribuiu para a realização dos estudos.

Ao pessoal do LEAMS, agradeço pelo companheirismo, amizade e disponibilidade em ajudar vivenciados de forma intensa enquanto cada um trilhava a sua jornada. Rafaella Fagundes Xavier, Juliana Tiyaki Ito, Mahara Garcia Lemes Proença, Marcell Rocha Leite, Luiz Carlos Soares de Carvalho Júnior, Aline Duarte Ferreira Ceccato, Juliana Nicolino e Rafaela Cuissi, sem vocês os dias de laboratório não seriam tão produtivos e os momentos de descontração, tão divertidos! Foi um prazer conviver com vocês!

Agradeço aos professores inseridos no Programa de Pós Graduação da FCT/UNESP por partilharem seus conhecimentos e estrutura física disponível com os alunos, em especial aos professores Dr Marcelo Papoti, Carlos Marcelo Pastre, Luiz Carlos Marques Vanderlei e Rômulo Araújo Fernandes.

Aos colegas de mestrado, pela agradável convivência durante as disciplinas e confraternizações, e especialmente aos mestrandos Carlos Augusto Kalva Filho, Aline Fernanda Bernardo, Renata Claudino Rossi e Ana Laura Ricci Vitor, pela contribuição no desenvolvimento do meu raciocínio em questões que não estavam sob meu domínio, no início do mestrado.

Ao pessoal da Seção de Pós Graduação que sempre nos atende com muita competência, atenção e paciência, em especial ao André Trindade Meira, responsável pela área da Fisioterapia.

Aos alunos de iniciação científica do LEAMS e aos voluntários das pesquisas, que me proporcionaram a atuação prática e, conseqüentemente, amadurecimento do meu modo de ensinar, atender e promover a pesquisa científica.

Um agradecimento especial à minha família - pai, mãe, Paulinho e Nana - que me ensinou o valor da educação e sempre me incentivou nesta busca constante pelo conhecimento. Muito obrigada por todos os esforços e suportar minha ausência para que eu pudesse me dedicar exclusivamente ao mestrado. A finalização de mais esta etapa se deve muito à existência deste ambiente de confiança, segurança e amor criado por vocês.

Às companheiras de república, que cruzaram meu caminho pelo destino, mas pela afeição se tornaram minha família escolhida. Ariane Matayoshi, Amanda Denari, Bruna Loschi, Kátia Broek, Nathalia Savian e Alessandra Mantovani, agradeço muito pela amizade sincera, apoio, torcida e compreensão nestes anos de convivência!

Não poderia deixar de me lembrar dos queridos Bruno Mendes, Daniel Yago, Tatiane Soares, Nathália Corrêa, Rubens Vidal e Ricardo Côrtes, além da Juliana Garcia e família, que sempre estiveram presentes de forma especial ao longo desta caminhada.

Seriam necessárias inúmeras páginas para elencar todos que, mesmo indiretamente, participaram desta realização. Como isto não seria viável, quero agradecer a todos que cruzaram meu caminho porque me influenciaram de certa forma. Como disse o escritor, “cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só; leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo”.

Epigrafe

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

Apresentação	14
Resumo	17
Abstract	20
Introdução	23
Artigo 1: Marcadores inflamatórios na abstinência tabagística de curto prazo.....	27
Artigo 2: Efeitos da intensidade do consumo tabagístico no transporte mucociliar de tabagistas ativos.....	50
Conclusões	74
Referências	76
Anexos	

Apresentação

Este modelo alternativo de dissertação contempla o material originado a partir da pesquisa intitulada “**Tabagismo e mecanismos de defesa: resposta imune e transporte mucociliar**”, realizada no Laboratório de Estudos do Aparelho Muco-secretor (LEAMS), da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente.

Em consonância com as regras do programa de pós-graduação em Fisioterapia desta unidade, o presente material está dividido nas seguintes sessões:

- *Resumo*;

- *Abstract*;

- *Introdução*: contextualização do tema pesquisado;

- *Artigo 1*: Fernanda Maria Machado Rodrigues, Dionei Ramos, Rafaella Fagundes Xavier, Juliana Tiyaki Ito, Alcirene Policarpo de Souza, Rômulo Araújo Fernandes, Rubens Cecchini, Renata Calciolari Rossi e Silva, Alessandra Choqueta de Toledo, Flávia Alessandra Guarnier, Ercy Mara Cipulo Ramos. Marcadores inflamatórios na abstinência tabagística de curto prazo. A ser submetido ao periódico *Respiratory Medicine*.

- *Artigo 2*: Rafaella Fagundes Xavier, Dionei Ramos, Juliana Tiyaki Ito, Fernanda Maria Machado Rodrigues, Giovana Navarro Bertolini, Mariangela Macchione, Alessandra Choqueta de Toledo, Ercy Mara Cipulo Ramos. Efeitos da intensidade do consumo tabagístico no transporte mucociliar de tabagistas ativos (Effects of cigarette smoking intensity on mucociliary clearance of active smokers). Submetido ao periódico *Respiration*.

- *Conclusões*: obtidas a partir da pesquisa realizada;

- *Referências*: referentes ao texto da introdução.

- *Anexos*: O anexo 1 é referente as normas do Periódico Respiratory Medicine, de acordo com o qual os artigos foram redigidos.

Anexo 2 é referente as normas do Periódico Respiration, de acordo com o qual os artigos foram redigidos.

Tabagismo e mecanismos de defesa: resposta imune e transporte mucociliar

Introdução: O tabagismo é uma pandemia que causa inúmeros malefícios à saúde, dentre eles estão o aumento da inflamação sistêmica e o prejuízo do transporte mucociliar. Ambos colaboram para o aumento da frequência ou da severidade de infecções respiratórias em indivíduos com e sem doenças pulmonares crônicas tabaco relacionadas. A cessação tabagística é capaz de trazer benefícios, mas não se está bem estabelecido o comportamento dos marcadores inflamatórios nesta condição. Além disso, os efeitos da intensidade tabagística no prejuízo do transporte mucociliar também não foram completamente elucidados. **Objetivo:** Avaliar o comportamento sistêmico e local de marcadores inflamatórios em 30 dias de abstinência tabagística além dos efeitos das intensidades de consumo tabagístico no transporte mucociliar de tabagistas ativos. **Métodos:** Foram avaliados tabagistas participantes de um Programa de cessação do tabagismo que foram divididos entre abstinentes e tabagistas ativos para a determinação dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 sistêmicos e locais. Os tabagistas também foram divididos de acordo com a intensidade de consumo (tabagistas leves, moderados e intensos) para a avaliação do histórico tabagístico, grau de dependência à nicotina, função pulmonar, monóxido de carbono no ar exalado (COex), carboxihemoglobina (COHb) e transporte mucociliar (teste de tempo de trânsito de sacarina - TTS). **Resultados:** Tabagistas abstinentes mostraram queda significativa nos valores de TNF- α no soro sanguíneo com 30 dias de abstinência ($P=0,007$) quando comparados ao comportamento desta variável de tabagistas ativos. Os demais marcadores não apresentaram mudanças significativas em seus comportamentos. Em

relação aos efeitos das intensidades de consumo, notou-se que tabagistas moderados e intensos tiveram maior TTS ($P=0.0001$), COex ($P <0.0001$) e COHb ($P <0.0001$) em comparação aos fumantes leves e não fumantes. Foi observada correlação positiva entre TTS e COex ($r=0.4$; $p<0.0001$); TTS e cigarros/dia ($r=0.3$, $p=0.02$) e entre COex e cigarros/dia ($r=0.3$, $p<0.01$). **Conclusões:** Tabagistas com abstinência de 30 dias apresentaram redução do marcador pró inflamatório primário, sem no entanto, apresentarem resposta anti - inflamatória. O prejuízo causado pelo tabagismo no transporte mucociliar está associado com a intensidade do consumo tabagístico.

Palavras chave: Tabagismo, Marcadores inflamatórios, Transporte mucociliar.

Abstract

Smoking and defense mechanisms: immune response and mucociliary clearance.

Introduction: Smoking is a pandemic that causes numerous health hazards, including increased systemic inflammation, impaired mucociliary clearance and increased frequency or severity of respiratory infections in individuals with and without chronic lung diseases related to tobacco. Smoking cessation can bring benefits, but is not well established the inflammatory markers' behavior at such condition. Besides that, the effects of the cigarette consumption intensity on impairment of mucociliary clearance have not been fully investigated. **Aim:** To evaluate the systemic and local behavior of the inflammatory markers at 30 days of smoking abstinence besides the effects of tobacco consumption intensities on mucociliary clearance of active smokers. **Methods:** We evaluated smokers participating in a smoking cessation program, who were divided between active and abstinent smokers for determination of the systemic and local inflammatory markers TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-10, and they were also divided according to their consumption intensity (light, moderate and heavy smokers) for the assessment of smoking history, degree of nicotine dependence, lung function, carbon monoxide in exhaled air (COex), carboxyhemoglobin (COHb) and mucociliary clearance (saccharin transit time test - STT). **Results:** Abstinent smokers showed a significant decrease in the amounts of TNF- α in blood serum with 30 days of abstinence ($P = 0.007$) when compared to the behavior of this variable in active smokers. The other inflammatory markers showed no significant change in their behavior. Regarding the effects of the consumption intensity, it was noted that moderate and heavy smokers had higher TTS ($P = 0.0001$), COex ($P < 0.0001$) and COHb ($P < 0.0001$) compared to light smokers and

nonsmokers. Positive correlation was observed between TTS and COex ($r = 0.4$, $p < 0.0001$); TTS and cigarettes / day ($r = 0.3$, $p = 0.02$) and between COex and cigarettes / day ($r = 0.3$, $p < 0.01$). **Conclusions:** Smokers with 30 days of abstinence presented systemic decrease of primary pro inflammatory marker, without, however, presenting anti-inflammatory response. The damage caused by smoking in mucociliary clearance is associated with the smoking intensity.

Key words: Smoking, Inflammatory markers, Mucociliary clearance

Estimativas da Organização Mundial da Saúde indicam que a prevalência do tabagismo atinge um terço da população mundial (1 bilhão e 200 milhões de pessoas) e, atualmente, é considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública, sendo responsável pelo maior número de mortes evitáveis no mundo.^{1,2}

A mortalidade por câncer de pulmão é considerada um importante indicador das características da epidemia tabagística e das suas consequências à saúde, já que cerca de 70% das mortes por esta causa no mundo são explicadas pelo uso de tabaco.³

Entretanto, muitos outros efeitos deletérios, além do desenvolvimento do câncer de pulmão, são decorrentes do tabagismo. Existem aproximadamente 4720 substâncias químicas no cigarro que exercem efeitos cancerígenos, mutagênicos, tóxicos e irritantes.⁴ A agressão causada por essas substâncias afeta intensamente o trato respiratório, podendo ocasionar lesão, metaplasia ou morte celulares, além de inflamação local e sistêmica.^{5,6}

Desta forma, esses efeitos causados pelo tabagismo geram alterações sistêmicas e locais, que afetam intensamente o trato respiratório, prejudicando a resposta imune e a barreira mecânica do sistema respiratório.^{6,7,8}

As células epiteliais são conhecidas por sua função de barreira protetora contra o ambiente externo, mas existe crescente evidência de que também participem da modulação da resposta imune, além dos macrófagos, neutrófilos e linfócitos. As células relacionadas à resposta imune secretam algumas substâncias que desencadeiam o processo inflamatório e outras que controlam a inflamação. São conhecidos como causadores da inflamação o fator de necrose tumoral- α (TNF- α – Tumor necrosis factor), o interferon-gamma (IFN- γ) e as interleucinas 1, 2, 6, 8, 12, 16,

18 (IL1, IL2, IL6, IL8, IL12, IL16 e IL18); já as interleucinas 4, 5, 10, 13 e 19 (IL4, IL5, IL10, IL13 e 19) estão relacionadas à resposta anti-inflamatória pela produção de anticorpos e exercem proteção contra infecção.^{9,10,11,12,13}

Além de interferir na função imune, essas mudanças nas células epiteliais podem causar remodelamento no trato respiratório com um aumento no número de células caliciformes e hipertrofia de células mucosas, culminando em aumento considerável na produção de muco.^{8,14} Além disso, as células ciliadas também sofrem alterações em decorrência da exposição à fumaça do cigarro, como aumento de cílios anormais e diminuição da frequência do batimento ciliar. A soma dessas alterações resulta em prejuízo do transporte mucociliar.^{15,16,17}

O transporte mucociliar é um importante mecanismo de defesa do trato respiratório porque aprisiona e expelle os agentes agressores. O funcionamento adequado desse mecanismo depende da estrutura, frequência e sincronia do batimento ciliar, além da quantidade e qualidade da secreção brônquica.¹⁸ Alguns estudos têm mostrado que tabagistas crônicos apresentam transporte mucociliar diminuído.^{19,20,21,22} Entretanto, um estudo prévio de nosso laboratório mostrou que este mecanismo pode se recuperar em 15 dias sem exposição tabagística.²³

Assim, verificam-se os malefícios causados pelo tabagismo nos mecanismos de defesa do hospedeiro, como o sistema imune e o transporte mucociliar. Desta forma, a principal intervenção no tratamento e prevenção destas consequências, é a cessação tabagística.

A cessação do tabagismo gera inúmeros benefícios imediatos e a médio e longo prazo para a saúde, independentemente do sexo ou da presença de doenças relacionadas ao tabagismo já existentes no momento da cessação.²⁴

Os tabagistas que abandonam o hábito antes dos 50 anos de idade diminuem em 50% o risco de morte nos próximos 15 anos, em comparação com os que continuam a fumar. Os que param antes dos 30 anos diminuem quase totalmente o excesso de risco.⁵ Mesmo depois dos 65 anos, a cessação tabagística diminui o risco de desenvolvimento de uma doença tabaco relacionada, ou diminui a progressão dessas doenças, quando pré existentes.²⁵ A cessação do ato de fumar também diminui o risco de morte prematura, já que os tabagistas morrem cerca de 13 anos mais cedo que não tabagistas. Todas as causas de mortalidade alcançam os níveis de pessoas que nunca fumaram depois de 10 a 15 anos de abstinência.²⁴

A partir do exposto, sabe-se que o tabagismo causa alterações prejudiciais ao funcionamento adequado de vários sistemas e que a cessação tabagística promove efeitos benéficos na saúde destes indivíduos; contudo não está bem estabelecido qual o comportamento da resposta imune frente a um período de abstinência e a condição do transporte mucociliar submetido a diferentes cargas de exposição.

Portanto, os objetivos dos artigos presentes nesta dissertação foram:

_ Avaliar o comportamento sistêmico e local de marcadores inflamatórios em 30 dias de abstinência tabagística.

_ Avaliar os efeitos de diferentes intensidades de consumo tabagístico no transporte mucociliar de tabagistas ativos.

Marcadores inflamatórios na abstinência tabagística de curto prazo

Fernanda Maria Machado Rodrigues¹, Dionei Ramos¹, Rafaella Fagundes Xavier¹, Juliana Tiyaki Ito¹, Alcirene Policarpo de Souza², Rômulo Araújo Fernandes,³ Rubens Cecchini⁴, Renata Calciolari Rossi e Silva⁵, Alessandra Choqueta de Toledo¹, Flávia Alessandra Guarnier⁴, Ercy Mara Cipulo Ramos¹.

1. Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, Brasil.
2. Departamento de Física, Química e Biologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, Brasil.
3. Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, Brasil.
4. Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.
5. Departamento de Patologia, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil.

Correspondência:

Ercy Mara Cipulo Ramos
Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista
Rua Roberto Simonsen, nº 305
19060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil
Tel.: +55 18 32214818 - Fax:55 18 32218212
E-mail: ercy@fct.unesp.br

RESUMO

Introdução: O tabagismo é uma pandemia que causa inúmeros malefícios à saúde, inclusive o aumento da inflamação sistêmica. A cessação tabagística é capaz de trazer benefícios, mas não se está bem estabelecido o comportamento dos marcadores inflamatórios nessas condições. **Objetivo:** Avaliar o comportamento sistêmico e local de marcadores inflamatórios em 30 dias de abstinência tabagística. **Métodos:** Vinte e cinco tabagistas foram incluídos e divididos em dois grupos: 14 tabagistas abstinentes e 11 tabagistas ativos. Foi realizada a determinação dos seguintes marcadores inflamatórios: TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 por meio de amostras de soro sanguíneo e lavado nasal, que foram coletadas no momento basal e em 30 dias de abstinência. **Resultados:** Tabagistas abstinentes mostraram queda significativa nos valores de TNF- α no soro sanguíneo com 30 dias de abstinência ($P=0,007$) quando comparados ao comportamento desta variável de tabagistas ativos. Os demais marcadores não apresentaram mudanças significativas em seus comportamentos. **Conclusão:** Fumantes com abstinência de 30 dias apresentaram redução sistêmica do marcador pró inflamatório primário, sem no entanto, apresentarem resposta anti - inflamatória.

Palavras chave: marcadores inflamatórios, cessação tabagística, tabagismo.

ABSTRACT

Introduction: Smoking is a pandemic which causes numerous health hazards, including increased systemic inflammation. Smoking cessation can cause benefits, but it is not well established the inflammatory markers' behavior at such conditions. **Aim:** To evaluate the systemic and local behavior of the inflammatory markers at 30 days of smoking abstinence. **Methods:** Where included twenty-five smokers and divided in two groups: 14 abstinent smokers and 11 active smokers. It was made the determination of the following inflammatory markers: TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 through samples of blood serum and nasal lavage, which were collected at baseline and at 30 days of abstinence. **Results:** Abstinent smokers showed significantly decrease in TNF- α values in blood serum within 30 days of smoking abstinence ($p=0,007$) when compared to the behavior of this variable in active smokers. The other markers showed no significant change in their behavior. **Conclusion:** Abstinent smokers for 30 days presented systematic reduction of the primary pro inflammatory marker without, however, presenting anti-inflammatory response.

Keywords: inflammatory markers, smoking cessation, smoking.

INTRODUÇÃO

O epitélio respiratório exerce função essencial na defesa do sistema respiratório, que está constantemente exposto à gases tóxicos e partículas agressoras presentes no ambiente, pois, além de atuar como barreira mecânica, participa da resposta imune do indivíduo.^{1,2,3}

São muitas as células envolvidas na resposta imune: epiteliais, macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T, que secretam substâncias responsáveis pela proteção do hospedeiro, muitas vezes por meio do desencadeamento de respostas inflamatórias.^{4,5,6}

As citocinas são conhecidas como marcadores destas respostas inflamatórias, que apresentam dois padrões; inflamatório e anti-inflamatório. O primeiro está relacionado à resposta pró inflamatória, com a participação das citocinas que amplificam o processo inflamatório, tais como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ) e as interleucinas 1, 2, 6, 8, 12, 16, 18 (IL1, IL2, IL6, IL8, IL12, IL16 e IL18). O segundo padrão causa resposta anti-inflamatória com a atuação das interleucinas 4, 5, 10, 13 e 19 (IL4, IL5, IL10, IL13 e 19). A atuação destes dois padrões mantém o equilíbrio da resposta imune.^{7,8,9,10}

Entretanto, sabe-se que a exposição prolongada à fatores nocivos, tais como fumaça do cigarro, induz uma resposta inflamatória sustentada que pode acarretar em danos ao epitélio, aumento da suscetibilidade à infecções e até mesmo em desenvolvimento de doenças pulmonares, como câncer e DPOC.^{11,12,13}

Os aspectos epidemiológicos do tabagismo são alarmantes, pois atinge um terço da população mundial adulta e causa atualmente 5,4 milhões de mortes em todo o mundo, sendo considerado uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde

(OMS)¹⁴. De acordo com estimativas da OMS, se não forem instituídas medidas eficazes de prevenção e controle, o número de mortes pode aumentar para mais de oito milhões em 2030.¹⁵

A cessação do tabagismo é uma terapêutica fundamental, já que são conhecidos benefícios substanciais da abstinência tabagística, tais como diminuição do risco de doença cardíaca coronariana e infarto, diminuição do declínio da função pulmonar, melhora na qualidade e expectativa de vida, além de indicadores de alterações na resposta imune, com aumento de mediadores anti-inflamatórios.^{7,16,17,18}

Considerando a preocupante abrangência do tabagismo e seus impactos na saúde, sua interferência na função imune mediada pelas células epiteliais, que é um mecanismo de defesa fundamental, e que existem benefícios com a cessação do hábito tabagístico, o interesse do estudo foi avaliar o comportamento sistêmico e local de marcadores inflamatórios em 30 dias de abstinência tabagística.

OBJETIVO

Avaliar o comportamento sistêmico e local de marcadores inflamatórios em 30 dias de abstinência tabagística.

MÉTODOS

Amostra

Foram incluídos no estudo 25 tabagistas de ambos os gêneros, com mais de 20 anos de tabagismo, que se inscreveram no Programa de Orientação e Conscientização Anti Tabagismo. No decorrer do tratamento da cessação tabagística aqueles indivíduos

que pararam de fumar compuseram o grupo abstinente e aqueles que não conseguiram parar compuseram o grupo de tabagistas ativos.

Todos os participantes foram previamente informados sobre os objetivos e procedimentos do estudo e, depois de sua aprovação, assinaram um termo de consentimento de acordo com a Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial para fazerem parte efetiva da pesquisa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (13/2010) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Presidente Prudente, Brasil. Seriam excluídos indivíduos que apresentassem fibrose cística, bronquiectasia, síndrome dos cílios imóveis, história de cirurgia ou trauma nasal, doenças inflamatórias das vias aéreas superiores e tabaco relacionadas verificadas por meio de questionamento de diagnóstico prévio, avaliação clínica e/ou certificadas por espirometria e que abandonassem o Programa.

Desenho e protocolo do estudo

Os indivíduos incluídos no estudo foram avaliados na Clínica de Estudos e Atendimentos em Fisioterapia e Reabilitação da Universidade Estadual Paulista para uma avaliação inicial conduzida a fim de se obter dados pessoais, o histórico tabagístico (tempo de tabagismo, cigarros/dia e índice anos/maço) e nível de dependência nicotínica de acordo com o questionário de Fagerstrom,¹⁹ além de avaliar a função pulmonar²⁰ por meio da espirometria e a concentração de monóxido de carbono no ar exalado (COex), por meio da monoximetria.

Depois disso, foi realizada a determinação da quantidade de citocinas: TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 por meio de amostras de soro sanguíneo e lavado nasal. Estas

avaliações foram conduzidas em dois momentos diferentes: basal (enquanto mantinham o hábito tabagístico, mas sob 12 horas de abstinência) e 30 dias de abstinência. As avaliações dos tabagistas ativos foram realizadas nos mesmos momentos, contudo, os indivíduos não alteraram o hábito tabagístico.

Todos os indivíduos foram instruídos a não fazer uso de agentes farmacológicos tais como anestésicos, analgésicos, barbitúricos, tranqüilizantes, antidepressivos, assim como álcool e substâncias à base de cafeína durante as últimas 12 horas antecedentes às avaliações. Os tabagistas ativos também foram orientados a não fumar nas 12 horas antecedentes às avaliações a fim de se excluir o efeito agudo do ato de fumar. A abstinência tabagística era confirmada por meio da monoximetria.

As avaliações foram realizadas pela manhã (entre 8 e 9 am); a temperatura ambiente foi mantida a 24°C e a umidade relativa do ar entre 50 e 60% para evitar variação nos parâmetros analisados.

Função Pulmonar

Foi realizada espirometria de acordo com as Diretrizes da American Thoracic Society, utilizando um espirômetro portátil (Spirobank-MIR, Itália, versão 3.6).²⁰ Foram utilizados os valores de referência específicos para a população brasileira.²¹

Monóxido de carbono no ar exalado

Esta variável foi medida por meio de um analisador de CO (Micro CO Meter, Cardinal Health, UK). Os indivíduos foram instruídos a permanecer em apnéia durante

20 segundos e então exalar lentamente a partir da capacidade vital funcional através de um bocal. Dois registros sucessivos foram feitos e o maior valor foi considerado.

Determinação da quantidade de citocinas

Soro sanguíneo

Um profissional treinado coletou em um tubo seco uma amostra de dois ml de sangue da veia antecubital dos indivíduos. A amostra foi deixada em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugada a 600g para a separação total do soro, que foi coletado, codificado e congelado a -70°C.

Lavado nasal

Para a coleta do lavado nasal foi solicitado aos indivíduos que inclinassem a cabeça para trás e fizessem uma pausa respiratória por 10 segundos. Foram instilados três mililitros (ml) e meio de salina em temperatura ambiente dentro de cada narina por meio de uma seringa descartável de 10ml. Depois de 10 segundos, os indivíduos fletiam o pescoço e o líquido era expelido em um recipiente plástico estéril.²² O material foi transferido para tubos cônicos graduados imersos em gelo, e então homogenizados em um Vortex por 15 segundos. Depois disso, as amostras foram colocadas em uma centrífuga refrigerada a 4°C sob rotação de 1000xg por 10 minutos e o supernatante aspirado e armazenado em tubos eppendorf de 1.5ml a -70°C.

Os níveis de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 no soro sanguíneo e lavado nasal foram medidos pelo kit ELISA de acordo com as instruções do fabricante.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi composta por valores de média, desvio-padrão, mediana e intervalo interquartilico. As comparações entre os dois grupos foram efetuadas pelo teste t de Student para dados independentes e o teste de Levene foi utilizado para corrigir distorções ocasionadas pelos tamanhos amostrais diferentes. Nas análises estatísticas referentes ao comportamento das variáveis após 30 dias, foram comparadas as diferenças entre os dois momentos de estudo, por meio da fórmula: Valor Final – Valor Inicial, as quais foram denominadas de deltas numéricos (Δ). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa SPSS (Versão 13.0) e todos os procedimentos estatísticos foram analisados considerando valores de significância (p) inferiores a 5%.

RESULTADOS

Os tabagistas incluídos foram divididos em dois grupos: 14 tabagistas abstinentes (2 homens, 49 ± 11 anos) e 11 tabagistas ativos (3 homens, 41 ± 10 anos). A caracterização da amostra, com valores de idade, IMC, espirométricos, histórico tabagístico e nível de dependência nicotínica, avaliado pelo teste de Fagerstrom estão apresentados na Tabela 1. Houve diferença estatística apenas no índice Capacidade vital forçada (CVF), em litros.

No momento basal de avaliação, tanto para as medidas extraídas do soro como do lavado nasal, a presença dos marcadores inflamatórios foi semelhante entre os dois grupos (Tabela 2).

Quando comparados os comportamentos das concentrações de marcadores inflamatórios após 30 dias de abstinência (Δ), verificou-se que tabagistas abstinentes apresentaram menores valores apenas para as medidas de TNF- α no soro sanguíneo (Tabela 3). Nas análises extraídas do lavado nasal, no período de 30 dias não houve diferença no comportamento de nenhuma das variáveis (Tabela3).

No grupo tabagistas abstinentes, do total de 14 indivíduos que iniciaram a abstinência, sete completaram os 30 dias de seguimento do estudo, dois voltaram a fumar novamente antes de completar sete dias de abstinência e cinco indivíduos recaíram antes de atingir 15 dias de abstinência, totalizando então uma perda de sete indivíduos que voltaram a fumar e abandonaram as avaliações, e uma taxa de sucesso de abstinência por 30 dias de 28%. No grupo de tabagistas ativos, entre os 11 indivíduos que iniciaram as avaliações, sete completaram 30 dias; os demais não deram segmento às avaliações (Figura 1).

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo, que investigou o comportamento sistêmico e local dos marcadores inflamatórios em tabagistas sob um período de 30 dias de abstinência tabagística, indicaram que esse período foi suficiente para a diminuição significativa da concentração de TNF α no soro sanguíneo de tabagistas abstinentes em comparação aos tabagistas que mantêm o hábito.

Os indivíduos incluídos nos grupos avaliados apresentaram características antropométricas e de histórico tabagístico semelhantes e ambos os grupos apresentaram função pulmonar normal. Apesar de haver diferença estatística no índice

espirométrico capacidade vital forçada (CFV) em litros, esta não é considerada clinicamente significativa e, quando esse valor foi normalizado pela porcentagem prevista dos indivíduos, a diferença deixou de existir.

O tabagismo exerce seus primeiros efeitos no trato respiratório e está associado ao desenvolvimento de várias doenças, tais como câncer e DPOC, que provoca obstrução das vias aéreas e inflamação local e sistêmica.^{23,24} Ainda não está bem estabelecido de quais processos resulta a supressão da imunidade dos tabagistas, entretanto, sabe-se que o tabagismo interfere no balanço das citocinas pró e anti-inflamatórias, que é fundamental para o funcionamento adequado do sistema imune.²⁵ Mesmo tabagistas assintomáticos apresentam sinais de inflamação, manifestados pelo aumento do número de macrófagos, neutrófilos e células T CD8⁺ no epitélio das vias aéreas quando comparados com indivíduos não tabagistas.^{26, 27,28}

Na avaliação basal, as concentrações dos marcadores inflamatórios TNF α , IL-6, IL-8 e IL-10 foram semelhantes entre os dois grupos nas análises tanto do soro sanguíneo quanto do lavado nasal. Contudo, ao comparar o comportamento de tais marcadores ao final de 30 dias de abstinência, pôde-se observar que houve diminuição significativa dos níveis de TNF α no soro sanguíneo dos tabagistas abstinentes quando comparados aos tabagistas ativos.

Sabe-se que a cessação do tabagismo diminui a progressão da DPOC e aumenta a expectativa de vida^{7,24,29} e existem indicadores de mudanças no quadro inflamatório de tabagistas assintomáticos, como a diminuição de números de macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar.^{24,30,31}

O TNF α é o primeiro mediador inflamatório, liberado principalmente por macrófagos, monócitos e células Th1 e que exerce uma função essencial na resposta inflamatória à um estímulo infeccioso, sendo considerado um importante fator no desenvolvimento da injúria pulmonar secundária ao tabagismo.^{8,32,33,34} No presente estudo pôde se observar que uma vez cessada a agressão decorrente do tabagismo, a liberação sistêmica de tal interleucina foi diminuída.

O fato da diminuição dos valores de TNF α ter acontecido apenas no soro sanguíneo sem concomitância com o lavado nasal pode ser explicado pelo remodelamento epitelial do trato respiratório submetido à exposição crônica à fumaça do cigarro³⁵ que, mesmo em indivíduos assintomáticos não respondeu de maneira significativa ao período de 30 dias de abstinência.

Em relação à resposta anti-inflamatória, a IL-10 tem sido descrita a principal citocina liberada pelas células Th2^{33,36} e se apresenta diminuída no lavado broncoalveolar de ratos expostos à fumaça do cigarro.²⁴ Entretanto, Zeidel *et al*, ao estudar a produção de interleucinas em células in vitro, verificaram que não houve diferença na liberação de IL-10 entre os grupos tabagista assintomático e não fumante.²⁵

Neste estudo, o período de 30 dias de abstinência não foi suficiente para promover alteração na liberação da IL-10, mas os valores basais dos indivíduos tabagistas foram semelhantes aos encontrados por Zeidel *et al*. A partir desta semelhança, inferimos que nossas amostras de tabagistas também não apresentavam alteração desta interleucina mesmo sob a exposição do tabagismo e, quando em situação de abstinência, mantiveram este comportamento.

Apesar de termos avaliado os tabagistas que mantiveram o hábito tabagístico como forma de controle para as análises dos marcadores inflamatórios em situação de abstinência tabagística, pode-se apontar como limitação do estudo a ausência de um grupo não fumante. Tal grupo poderia somar informações a respeito dos marcadores inflamatórios na ausência da exposição tabagística e, por exemplo, se houvesse constatação de semelhança nas concentrações das citocinas IL-6 e IL-8 entre tabagistas e não tabagistas já no momento basal, isto poderia justificar o fato do período de abstinência não ter influenciado de forma significativa tais concentrações.

CONCLUSÃO

Fumantes com abstinência de 30 dias apresentaram redução sistêmica do marcador pró inflamatório primário, sem no entanto, apresentarem resposta anti-inflamatória.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho obteve apoio das agências Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Programa Institucional da Pró-Reitoria de Extensão-PROEX /UNESP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Domagala-Kulawik J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Dec; 59 Suppl 6:19-34.
2. Scheuch G, Kohlhäufel M, Möller W, Brand P, Meyer T, Häussinger K, et al. Particle clearance from the airways of subjects with hyperresponsiveness and with chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res*. 2008 Nov; 34(9):531-49.
3. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004 Aug 21-27; 364(9435):709-21.
4. Whetzel CA, Corwin EJ, Klein LC. Disruption in Th1/Th2 immune response in young adult smokers. *Addict Behav*. 2007 Jan;32(1):1-8. Epub 2006 Apr 27.
5. D'Elia M, Del Prete G. Th1/Th2 balance in human disease. *Transplant Proc*. 1998 Aug;30(5):2373-7.
6. Petersen AM, Pedersen BK. The anti inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005 Apr;98(4):1154-62.
7. Kunz LI, Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Budulac SE, Timens W, van Wijngaarden S, et al. Smoking status and anti inflammatory macrophages in bronchoalveolar lavage and induced sputum in COPD. *Respir Res*. 2011 Mar 22;12:34.
8. Urbankowski T, Hoser G, Domagała-Kulawik J. Th1/Th2/Th17 – related cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis: association with smoking. *Pol Arch Med Wewn*. 2012;122(7-8):320-5.
9. Freeman CM, Curtis JL, Chensue SW. CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8 cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity. *Am J Pathol*. 2007; 171: 767-76.

10. DeFranco A, Howard J, Janeway C, Littman D, Marrack P, Mitchison NA et al. Sistema Imune Adaptativo. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editores. *Biologia Molecular da Célula*. 2.ed. São Paulo: Artmed. 2006; 1363-1421.
11. Paone G, Conti V, Vestri A, Leone A, Puglisi G, Benassi F, et al. Analysis of sputum markers in the evaluation of lung inflammation and functional impairment in symptomatic patients. *Dis Markers*. 2011; 31 (2):91-100.
12. Wattenberg EV. *Noncarcinogenic effects of cigarette smoke on the respiratory tract*. University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA. 2010.
13. Comandini A, Rogliani P, Nunziata A, Cazzola M, Curradi G, Saltini C. Biomarkers of lung damage associates with tobacco smoke in induced sputum. *Respir Med*. 2009 Nov;103(11):1592-613. Epub 2009 Jul 15.
14. Rosemberg J. *Pandemia do tabagismo: enfoques históricos e atuais*. São Paulo: Secretaria da Saúde, 2002. 184 p.
15. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The mpower package. Geneva: World Health Organization; 2008.
16. Lao XQ, Jiang CQ, Zhang WS, Adab P, Lam TH, Cheng KK. Smoking, smoking cessation and inflammatory markers in older Chinese men: The Guangzhou Biobank Cohort Study. *Atherosclerosis*. 2009 Mar;203(1):304-10. Epub 2008 Jul 6.
17. Reichert J, Araújo AJ, Gonçalves CMC, Godoy I, Chatkin JM, Sales MPU, et al. Diretrizes para a cessação do tabagismo – 2008. *J Bras Pneumol*. 2008; 34 (10): 845-880.

18. Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax*. 2002 Sep; 57(9):759- 64.
19. Fagerström KO, Heatherton TF, Kozlowski LT. Nicotine addiction and its assessment. *Ear Nose Throat J*. 1990; 69(11): 763-5.
20. American Thoracic Society. Standardization of spirometry: 1994 update. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1995; 152(3): 1107-36.
21. Duarte AA, Pereira CAC, Rodrigues SC. Validation of new Brazilian predicted values for forced spirometry in caucasians and comparison with predicted values obtained using other reference equations. *J. Bras. Pneumol*. 2007; 33(5): 527-35.
22. Raulf-Heimsoth M, Wirtz C, Papenfuss F, Baur X. Nasal lavage mediator profile and cellular composition of nasal brushing material during latex challenge tests. *Clinical and Experimental Allergy*. 2000; 30: 110-121.
23. Bouloukaki I, Tsiligianni IG, Tsoumakidou M, Mitrouska I, Prokopakis EP, Mavroudi I, et al. Sputum and nasal lavage lung specific biomarkers before and after smoking cessation. *BMC Pulm Med*. 2011 Jun 2;11:35.
24. Braber S, Henricks PA, Nijkamp FP, Kraneveld AD, Folkerts G. Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation. *Respir Res*. 2010 Jul 22;11:99.
25. Zeidel A, Beilin B, Yardeni I, Mayburd E, Smirnov G, Bessler H. Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2002 Sep;46(8):959-64.

26. Isajevs S, Taivans I, Svirina D, Strazda G, Kopeika U. Patterns of inflammatory responses in large and small airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*. 2011;81(5):362-71. Epub 2011 Jan 12.
27. Tamimi A, Serdarevic D, Hanania NA. The effects of cigarette smoke on airway inflammation in asthma and COPD: Therapeutic implications. *Respir Med*. 2012 Mar; 106(3):319-28. Epub 2011 Dec 22.
28. Andelid K, Bake B, Rak S, Lindén A, Rosengren A, Ekberg-Jansson A. Myeloperoxidase as a marker of increasing inflammation in smokers without severe airway symptoms. *Respir Med*. 2007 May;101(5):888-95. Epub 2006 Nov 13.
29. Pelkonen M, Notkola IL, Tukiainen H, Tervahauta M, Tuomilehto J, Nissinen A. Smoking cessation, decline in pulmonary function and total mortality: a 30 year follow up study among the Finnish cohorts of the Seven Countries Study. *Thorax*. 2001 Sep;56(9):703-7.
30. Willemsse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1 year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J*. 2005 Nov;26(5):835-45
31. Swan GE, Hodgkin JE, Roby T, Mittman C, Jacobo N, Peters J. Reversibility of airways injury over a 12-month period following smoking cessation program. *Chest*. 1992 Mar;101(3):607-12.
32. Díez Piña JM, Fernández Aceñero MJ, Llorente Alonso MJ, Díaz Lobato S, Mayoralas Alises S, Pérez Rodríguez E, *et al*. Tumor necrosis factor alpha as a marker of systemic and local inflammation in "healthy" smokers. *Med Clin (Barc)*. 2012 Jun 16;139(2):47-53.

33. Pelegriño NR, Tanni SE, Amaral RA, Angeleli AY, Correa C, Godoy I. Effects of active smoking on airway and systemic inflammation profiles in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Med Sci*. 2012 Aug 7.
34. Cianciarullo MA, Ceccon MEJ; Yamamoto L; Del Negro GMB; Okay TS. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. *Rev Bras Crescimento Desenvol Hum*. 2008; 18(2): 135-147.
35. Herfs M, Hubert P, Poirrier AL, Vandevenne P, Renoux V, Habraken Y, *et al*. Proinflammatory cytokines induce bronchial hyperplasia and squamous metaplasia in smokers: implications for Chronic Obstructive Pulmonary Disease therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Jul;47(1):67-79. Epub 2012 Feb 16.
36. Ogawa Y, Duru EA, Ameredes BT. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr Mol Med*. 2008 Aug;8(5):437-45.

TABELAS E FIGURA

Tabela 1. Dados referentes às características antropométricas, valores espirométricos e histórico tabagístico de tabagistas abstinentes e tabagistas ativos.

	Tabagistas Abstinentes	Tabagistas Ativos	P
	Média ± DP	Média ± DP	
Características Antropométricas			
Homens (%)	13	27	
Idade (anos)	49,14 ± 11,09	41,90 ± 10,45	0,1205
IMC (kg/m ²)	27 ± 3	24 ± 6	0,1567
Valores Espirométricos			
VEF ₁ /CVF (%)	79,19 ± 9,25	79,18 ± 13,97	0,9970
VEF ₁ (L)	2,48 ± 0,79	2,66 ± 0,61	0,4177
VEF ₁ (% prev)	91,69 ± 12,76	95,48 ± 18,13	0,5885
CVF (L)	3,10 ± 0,75	3,71 ± 0,79*	0,0229
CVF (%prev)	97,19 ± 9,87	102,20 ± 12,70	0,3384
Histórico Tabagístico			
Cigarros/dia [§]	20 [18,00 - 26,25]	15 [11,50 - 20,00]	0,1065
Anos de fumo [§]	30 [23,50 - 38,50]	28 [21,30 - 35,50]	0,8009
Anos/maço [§]	13 [6,36 - 36,00]	17 [10,20 - 26,00]	0,7630
Dependência nicotínica [§]	5 [4 - 7]	4 [3 - 6]	0,3401

DP= desvio-padrão; IMC: Índice de massa corporal; VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: Capacidade vital forçada. *p<0,05 *versus* Tabagistas Abstinentes. §= Valores expressos em Medina [intervalo interquartilico].

Tabela 2. Concentração dos marcadores inflamatórios no momento basal nos grupos Tabagistas Abstinentes e Tabagistas Ativos.

	Tabagistas Abstinentes	Tabagistas Ativos	p
Marcadores Inflamatórios			
Soro Sanguíneo			
TNF α (pg/ml)	9,62 \pm 6,65	7,42 \pm 4,20	0,197
IL-6 (pg/ml)	0,29 \pm 0,21	0,36 \pm 0,17	0,449
IL-8 (pg/ml)	9,05 \pm 5,43	7,50 \pm 6,83	0,389
IL-10 (pg/ml)	11,58 \pm 4,62	11,77 \pm 6,39	0,933
Lavado Nasal			
TNF α (pg/ml)	11,65 \pm 2,52	10,48 \pm 4,64	0,447
IL-6 (pg/ml)	24,07 \pm 14,93	28,63 \pm 9,26	0,449
IL-8 (pg/ml)	107,47 \pm 48,06	129,93 \pm 69,09	0,553
IL-10 (pg/ml)	10,34 \pm 5,10	13,27 \pm 7,74	0,319

TNF α : Fator de necrose tumoral (Tumor necrosis factor); IL-6: Interleucina 6; IL-8: Interleucina 8; IL-10: Interleucina 10.

Tabela 3. Comparação dos deltas numéricos entre os grupos Tabagistas Abstinentes e Tabagistas Ativos.

	Tabagistas Abstinentes	Tabagistas Ativos	p
Marcadores Inflamatórios			
Soro Sanguíneo			
TNF α	-5,55 \pm 5,23	3,40 \pm 3,91*	0,007
IL-6	0,06 \pm 0,17	-0,01 \pm 0,99	0,305
IL-8	-0,41 \pm 4,94	1,73 \pm 9,90	0,580
IL-10	1,66 \pm 7,24	2,33 \pm 11,09	0,891
Lavado Nasal			
TNF α	-0,56 \pm 5,54	-4,81 \pm 9,22	0,382
IL-6	-1,19 \pm 26,77	3,48 \pm 21,54	0,734
IL-8	-21,72 \pm 89,82	-74,99 \pm 83,84	0,293
IL-10	0,04 \pm 7,59	-3,46 \pm 5,81	0,366

TNF α : Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral); IL-6: Interleucina 6; IL-8: Interleucina 8; IL-10: Interleucina 10. *p<0,05 *versus* Tabagistas abstinentes.

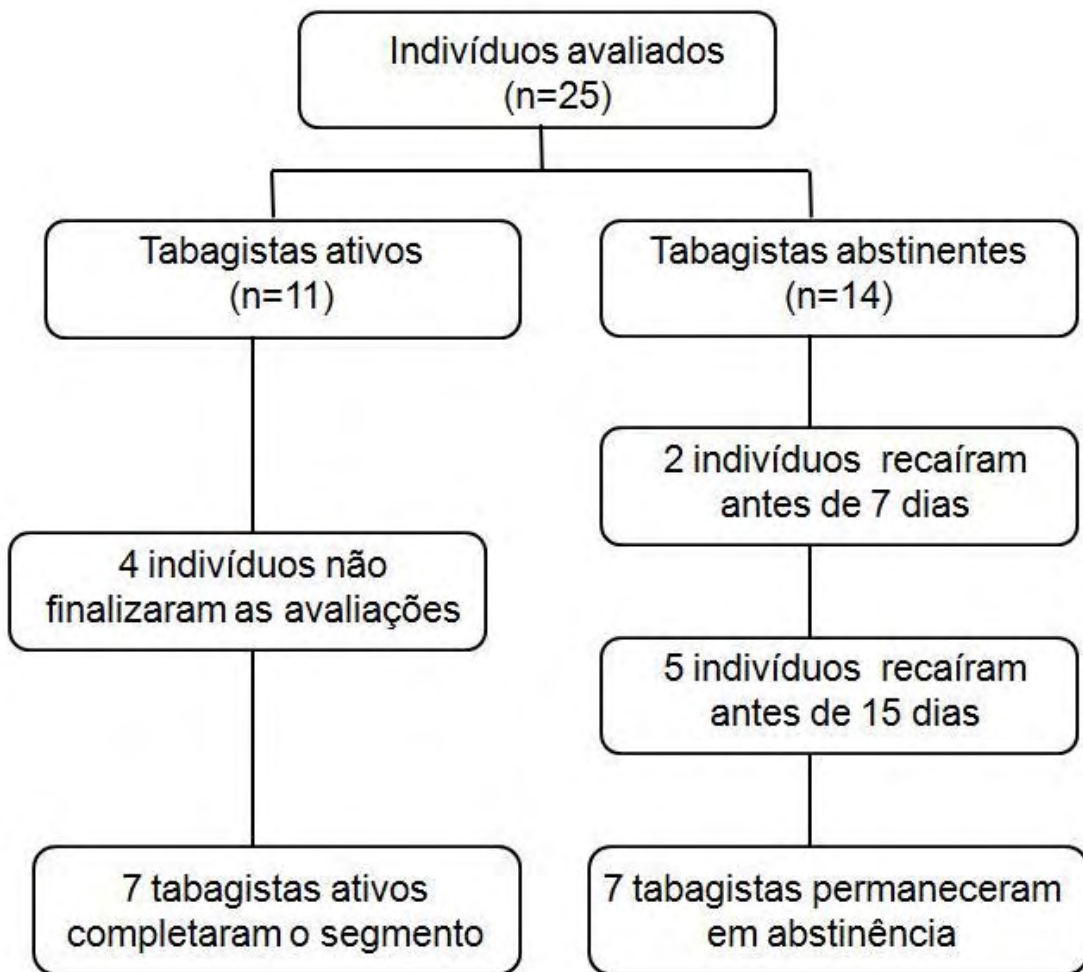


Figura 1. Diagrama de fluxo do estudo

Efeitos da intensidade do consumo tabagístico no transporte mucociliar de tabagistas ativos

¹Rafaella Fagundes Xavier, ¹Dionei Ramos, ¹Juliana Tiyaki Ito, ¹Fernanda Maria Machado Rodrigues, ¹Giovana Navarro Bertolini, ²Mariangela Macchione, ¹Alessandra Choqueta de Toledo, ¹Ercy Mara Cipulo Ramos

¹Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, Brasil.

²Departamento de Patologia, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil.

Título curto: Transporte mucociliar está associado com a intensidade de consumo tabagístico

Correspondência:
Ercy Mara Cipulo Ramos
Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista
Rua Roberto Simonsen, nº 305
19060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil
Tel.: +55 18 32214818 - Fax:55 18 32218212
E-mail: ercy@fct.unesp.br

RESUMO

Introdução: O tabagismo prejudica o transporte mucociliar e aumenta a frequência ou severidade de infecções respiratórias em indivíduos com e sem doenças pulmonares crônicas tabaco relacionadas. **Objetivo:** Avaliar os efeitos das intensidades de consumo tabagístico no transporte mucociliar de tabagistas ativos. **Métodos:** Setenta e cinco tabagistas ativos foram divididos antes de começar um programa de cessação tabagística de acordo com a intensidade de consumo em leves (1-10 cigarros/dia; n=14), moderados (11-20 cigarros/dia; n=34) e intensos (≥ 21 cigarros/dia; n=27). Foram avaliados o histórico tabagístico, grau de dependência à nicotina, função pulmonar, monóxido de carbono no ar exalado (COex), carboxihemoglobina (COHb) e transporte mucociliar (teste de tempo de trânsito de sacarina - TTS). Um grupo de indivíduos não tabagistas com idade semelhante foi avaliado com os mesmos testes. **Resultados:** Tabagistas moderados (49 ± 7 anos) e intensos (46 ± 8 anos) tiveram maior TTS ($P=0.0001$), COex ($P < 0.0001$) e COHb ($P < 0.0001$) em comparação aos fumantes leves (51 ± 15 anos) e não fumantes (50 ± 11 anos). Foi observada correlação positiva entre TTS e COex ($r=0.4$; $p < 0.0001$); TTS e cigarros/dia ($r=0.3$, $p=0.02$) e entre COex e cigarros/dia ($r=0.3$, $p < 0.01$). **Conclusão:** O tabagismo prejudica o transporte mucociliar e este prejuízo está associado com a intensidade do consumo tabagístico.

Palavras chave: transporte mucociliar, epitélio respiratório, tabagismo, lesão por inalação de fumaça, tabaco.

ABSTRACT

Background: Smoking impairs mucociliary clearance and increases the respiratory infections frequency or severity in subjects with and without smoking-related chronic lung diseases. **Objective:** This study evaluated the effects of smoking intensities on mucociliary clearance in active smokers. **Methods:** Seventy-five active smokers were divided into light (1-10 cigarettes/day; n=14), moderate (11-20 cigarettes/day; n=34) and heavy smokers (≥ 21 cigarettes/day; n=27) before starting a smoking cessation programme. The smoking behavior, nicotine dependence, pulmonary function, carbon monoxide in exhaled air (exCO), carboxyhemoglobin (COHb) and mucociliary clearance measured by saccharin transit time (STT) test were evaluated. An age-matched non-smokers (n=24) were assessed using the same tests. **Results:** Moderate (49 ± 7 years) and heavy smokers (46 ± 8 years) had higher STT ($P=0.0001$), exCO ($P < 0.0001$) and COHb ($P < 0.0001$) compared to light smokers (51 ± 15 years) and non-smokers (50 ± 11 years). Positive correlation was observed between STT and exCO ($r=0.4$; $p < 0.0001$); STT and cigarettes/day ($r=0.3$, $p=0.02$) and between exCO and cigarettes/day ($r=0.3$, $p < 0.01$). **Conclusion:** The smoke impairs mucociliary clearance and it is associated with cigarette smoking intensity.

Keywords: mucociliary clearance, respiratory epithelium, smoking, smoke inhalation injury, tobacco.

INTRODUÇÃO

A exposição à fumaça do cigarro é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de doenças respiratórias como câncer e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).^[1] Apesar do uso de tabaco ser a principal causa de mortes evitáveis no mundo, cerca de seis milhões de pessoas morrem de doenças relacionadas ao fumo e a Organização Mundial de Saúde estima que este número possa aumentar para oito milhões em 2030.^[2]

Estudos prévios indicam que a intensidade do consumo tabagístico influencia o risco de desenvolver doença pulmonar.^[3-9] Fumantes intensos têm maior risco relativo de desenvolver câncer de pulmão e DPOC comparados aos fumantes leves e moderados, respectivamente.^[10-11] Também tem sido relatado que o fumo do cigarro aumenta a frequência ou severidade de infecções respiratórias em indivíduos com e sem doenças pulmonares crônicas tabaco relacionadas.^[12]

A estratégia mais eficaz para diminuir a morbidade pelo fumo do cigarro é a redução o número de tabagistas ativos ou, pelo menos, a intensidade do consumo tabagístico.^[13-15]

A mistura complexa de milhares de componentes químicos na fumaça do cigarro é altamente tóxica.^[16] O monóxido de carbono (CO) é o gás mais tóxico presente na fumaça do cigarro. A produção endógena do CO é um processo relacionado ao estresse oxidativo e a heme oxigenase (HO) responde às condições nas quais o CO se encontra aumentado.^[17,18] Níveis altos de oxidantes e espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido detectados nas correntes principal e secundária da fumaça do cigarro

inalada por tabagistas ativos e passivos, o que fornece uma carga grande de oxidantes no epitélio das vias aéreas.^[19]

O mecanismo de defesa do trato respiratório é afetado por substâncias presentes na fumaça do cigarro.^[20] Seu funcionamento adequado depende da frequência de batimento ciliar, propriedades físicas e de transportabilidade do muco respiratório e da interação entre os cílios e a camada de muco.^[21] A fumaça do cigarro causa mudanças na frequência de batimento ciliar (FBC) e estudos *in vitro* mostraram que a cotinina, um metabólito do tabagismo, reduz a FBC e a fase particulada da fumaça do cigarro reduz a resposta da FBC após um estímulo.^[22,23]

Apesar das evidências de que a fumaça do cigarro influencia negativamente o transporte mucociliar e diminui as respostas protetoras do indivíduo à infecção, os efeitos da intensidade do consumo tabagístico no prejuízo do transporte mucociliar não foi completamente investigado em tabagistas. Nós hipotetizamos que o transporte mucociliar está prejudicado em fumantes com maiores intensidades de exposição.

MÉTODOS

Amostra

Foram avaliados 117 participantes (93 tabagistas ativos e 24 indivíduos não tabagistas) que, informados previamente sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e, após a aprovação, assinaram um termo de consentimento escrito de acordo com a Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (12/2010) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Presidente Prudente, Brasil.

Foram incluídos tabagistas de ambos os sexos, com tempo mínimo de 20 anos de tabagismo e os critérios de exclusão foram presença de fibrose cística, broquiectasia, síndrome dos cílios imóveis, história de cirurgia ou trauma nasal, doença inflamatória das vias aéreas superiores, DPOC e doenças tabaco relacionadas certificadas clinicamente e/ou por espirometria.

Foram avaliados 93 tabagistas que se inscreveram no Programa de Cessação do Tabagismo, conduzido no Centro de Estudos e Atendimento em Fisioterapia e Reabilitação (CEAFiR) da Universidade Estadual Paulista de Presidente Prudente, Brasil. Após realizar a realização da espirometria, 18 tabagistas foram excluídos por apresentar alteração da função pulmonar. Os demais 75 tabagistas foram classificados em leves (1-10 cigarros/dia; n=14), moderados (11-20 cigarros/dia; n=34) e fumantes intensos (≥ 21 cigarros/dia; n=27).^[24] A intensidade do consumo tabagístico foi avaliada pelo auto relato e confirmada por valores de COex.^[25]

Vinte e quatro indivíduos controle saudáveis, não tabagistas, com idade semelhante e função pulmonar normal também foram avaliados (Figura1).

Desenho e protocolo do estudo

Os indivíduos incluídos neste estudo foram avaliados no CEAFiR da Universidade Estadual Paulista em uma avaliação inicial conduzida a fim de se obter dados pessoais, histórico tabagístico (anos de tabagismo, cigarros/dia e índice anos/maço), dependência nicotínica de acordo com o questionário de Fagerstrom e função pulmonar pela espirometria.^[25,26] Os indivíduos foram instruídos a permanecer em abstinência nas últimas 12 horas antecedentes aos testes. O monóxido de carbono

no ar exalado (COex), Carboxihemoglobina (COHb) e o teste de tempo de trânsito de sacarina (TTS) foram mensurados pela manhã (entre 8 e 9 am); a temperatura foi mantida a 24°C e a umidade relativa do ar de 50 a 60% para evitar variações nos parâmetros analisados.

Função Pulmonar

Foi realizada espirometria de acordo com as Diretrizes da American Thoracic Society, utilizando um espirômetro portátil (Spirobank-MIR, Itália, versão 3.6)^[26] Os valores de referência foram específicos para a população brasileira.^[27]

Monóxido de carbono exalado e Carboxihemoglobina

O COex e a COHb foram medidos utilizando-se um analisador de CO (Micro CO Meter, Cardinal Health, UK).^[28] Os indivíduos foram instruídos a permanecer em apnéia durante 20 segundos e então exalar lentamente a partir da capacidade vital funcional através de um bocal. Dois registros sucessivos foram feitos e o maior valor foi considerado.^[29]

Teste de tempo de trânsito de sacarina

O transporte mucociliar foi medido pelo teste de tempo de trânsito de sacarina (TTS), como descrito previamente por Salah et al.^[30] Os indivíduos foram posicionados sentados com a cabeça estendida a 10° e foi depositada sacarina sódica (2,5 mg) granulada sob controle visual a 2 cm dentro da narina direita. O transporte mucociliar nasal foi medido como o tempo que os indivíduos levaram para sentir um sabor em sua

boca. O sabor esperado não era especificado a fim de evitar falsos positivos. Se não houvesse resposta depois de 60 minutos, o teste era concluído depois de confirmar que o indivíduo tinha a percepção normal do sabor doce por meio da colocação de grãos de sacarina diretamente em sua língua. Os indivíduos foram instruídos a não respirar profundamente, falar, tossir, espirrar ou assoar o nariz durante o teste.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o Graphpad Prism 3.0 (Inc., San Diego CA, USA). A distribuição normal dos dados foi avaliada usando o teste Kolmogorov-Smirnov. Comparações entre os grupos foram conduzidas pela análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey para dados paramétricos (idade, valores espirométricos e anos de tabagismo) ou por Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para os dados não paramétricos (IMC, questionário de Fagerstrom, COex, COHb, índice anos/maço, cigarros/dia e TTS). Os dados foram apresentados com média (desvio padrão) e valores de mediana (percentis 25% e 75%) de acordo com a normalidade. Correlações lineares foram avaliadas usando o coeficiente de correlação de Spearman. A significância estatística foi definida como $p < 0.05$.

RESULTADOS

O estudo incluiu setenta e cinco tabagistas, divididos de acordo com o consumo de cigarros em tabagistas leves ($n=14$); moderados ($n=34$) e intensos ($n=27$) e vinte e quatro indivíduos não tabagistas com idade semelhantes. Não houve diferença

significante nas características demográficas (gênero, idade e IMC) e valores espirométricos entre os grupos (Tabela 1).

O tempo de tabagismo foi similar ($p=0.23$) entre tabagistas leves (34 ± 13 anos, média \pm DP), moderados (30 ± 8 anos) e intensos (34 ± 5 anos). Tabagistas intensos apresentaram maior índice anos/maço comparados aos tabagistas moderados e leves ($p<0.0001$). O consumo diário de cigarros foi maior em tabagistas intensos comparados aos tabagistas moderados e leves ($p<0.0001$), enquanto os tabagistas moderados apresentaram maior consumo cigarros/dia do que os tabagistas leves ($p<0.0001$) (Tabela 2).

Não houve diferença significativa na dependência nicotínica entre os grupos, de acordo com o questionário de Fagerstrom (Tabela 2).

Tabagistas moderados e intensos tiveram maior TTS do que tabagistas leves e não tabagistas (Figura 2a; $p=0.0001$) e também apresentaram maior COex (Figura 2b; $p<0.0001$) e COHb (Figura 2c; $p<0.0001$). Foi observada correlação positiva entre TTS e COex (Figura 3a; $r=0.4$; $p<0.0001$); TTS e cigarros/dia (Figura 3b; $r=0.3$, $p=0.02$) e entre COex e cigarros/dia (Figura 3c; $r=0.3$, $p<0.01$).

DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou maior prejuízo do transporte mucociliar, assim como maiores níveis de COex e COHb em tabagistas moderados e intensos comparados a não tabagistas e tabagistas leves com tempo semelhante de tabagismo.

Estudos prévios estabeleceram a correlação entre o transporte mucociliar nasal e traqueobrônquico enfatizando a vantagem do teste de tempo de trânsito de sacarina

(TTS) como um método simples, de baixo custo e menos invasivo para avaliar a função mucociliar.^[31,32] Além disso, o transporte mucociliar medido pelo TTS tem sido bem correlacionado com a frequência de batimento ciliar e tem sido amplamente utilizado em estudos recentes.^[33-36]

A eficiência do transporte mucociliar depende de (a) qualidade e quantidade do muco e a profundidade da camada periciliar; (b) sincronia da frequência do batimento ciliar e estrutura do epitélio respiratório e (c) interação entre cílio e muco.^[37,38] O prejuízo do transporte mucociliar de indivíduos cronicamente expostos à fumaça do cigarro está associado com remodelamento epitelial, causando anormalidades estruturais nos cílios, metaplasia de células caliciformes e hipertrofia de células mucosas, resultando em produção aumentada de muco.^[38,39]

Além do prejuízo da superfície mucosa, a fumaça do cigarro também afeta as células imunes circulantes e as funções de células imunes inatas locais (macrófagos e neutrófilos).^[40] Estas mudanças associadas com remodelamento da via aérea e declínio da função respiratória aumenta o risco de desenvolvimento de DPOC e infecção por tuberculose, pneumonia bacteriana e influenza.^[41-43]

No presente estudo, tabagistas moderados e intensos tiveram prejuízo similar no transporte mucociliar e tabagistas leves apresentaram transporte mucociliar semelhante aos não tabagistas. Estudos prévios sugerem que a reologia do muco de tabagistas leves pode favorecer o transporte mucociliar^[44,45] e tem sido mostrada frequência basal aumentada do batimento ciliar no epitélio nasal humano de tabagistas intensos.^[46] Estes relatos sugerem que nossos achados em relação às diferenças no transporte

mucociliar podem estar mais relacionados à profundidade do muco na camada periciliar do que à frequência de batimento ciliar.

A exposição à fumaça do cigarro tem sido apresentada recentemente como redutora do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) resultando em depleção do líquido de superfície na via aérea e estase de muco no epitélio das vias aéreas. Isto está relacionado causalmente à redução do transporte mucociliar em tabagistas devido à inibição do transporte de fluidos dependentes do CFTR.^[47] Este mecanismo pode ser afetado pela intensidade do tabagismo e estudos futuros devem acessar esta questão.

Tabagistas moderados e intensos tiveram valores semelhantes de COex e COHb enquanto tabagistas leves apresentaram valores semelhantes a não tabagistas. Estes achados podem ser explicados por estudos prévios que encontraram altas concentrações de radicais livres na fase gasosa do cigarro, o que resulta em maior estresse oxidativo quanto maior a intensidade de exposição.^[48,49] Estudos têm reportado que o COex está presente nas doenças inflamatórias pulmonares e reflete indução do HO-1 e estresse oxidativo que prejudicam o transporte mucociliar.^[44,50] Desta forma, uma hipótese para um pior transporte mucociliar em tabagistas com COex aumentado é o maior nível de estresse oxidativo.

Adicionalmente, a correlação entre COex e consumo diário de cigarros está bem estabelecida e este estudo também observou uma correlação positiva entre COex e cigarros/dia.^[51] Os valores de TTS se correlacionaram positivamente com cigarros/dia e COex demonstrando que indivíduos com prejuízo no transporte mucociliar tiveram

maior consumo diário de cigarros e maior COex corroborando com estudos prévios.^[52,53,54]

Nossos resultados mostraram que tabagistas leves têm benefícios evidentes no transporte mucociliar comparados aos tabagistas moderados e intensos. Contudo, nosso estudo apresentou algumas limitações: nós não avaliamos o remodelamento da via aérea e a influência da redução do transporte mucociliar na frequência de infecções respiratórias. Estudos futuros devem ser realizados para esclarecer esses pontos.

Em síntese, nós mostramos que o fumo prejudica o transporte mucociliar e o prejuízo está associado com a intensidade do consumo tabagístico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelas seguintes agências científicas brasileiras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Programa Institucional da Pró Reitoria de Extensão – PROEX/UNESP.

REFERÊNCIAS

1. de Marco R, Accordini S, Marcon A, *et al.* Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a European Cohort of Young Adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: 891-7.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine.* 2006; 3(11): 2011-30.
3. US Department of Health, Education, and Welfare. Smoking and Health. A Report of the Surgeon General. Pub No. USDHEW (PHS) 79-5006. Washington, DC: Govt Printing Office, 1979.
4. US Department of Health and Human Services. Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. Pub. No. USDHHS (CDC) 89-8411. Washington, DC: Govt Printing Office, 1989.
5. US Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: Cardiovascular Disease. A Report of the Surgeon General. Pub No. USDHHS (PHS) 84-50204. Washington, DC: Govt Printing Office, 1983.
6. US Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: Cancer. A Report of the Surgeon General. Pub No. USDHHS (PHS) 82-50179. Washington, DC: Govt Printing Office, 1982.
7. Doll R, Peto R: Mortality in relation to smoking: 20 years observations on male British doctors. *Br. Med. J.* 1976; 2: 1525-36.
8. Lubin JH, Blot WJ, Berrino F, *et al.* Patterns of lung cancer risk according to type of cigarette smoked. *Int. J. Cancer.* 1984; 33: 569-76.

9. Rogot E, Murray JL. Smoking and causes of death among US veterans: 16 years of observation. *Public Health Rep.* 1980; 95: 213-22.
10. Weiss W, Boucot KR, Seidman H. Risk of lung cancer according to histologic type and cigarette dosage. *JAMA.* 1972; 222(7): 799-801.
11. Forey B, Thornton A, Lee P. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence relating smoking to COPD, chronic bronchitis and emphysema. *BMC Pulmonary Medicine.* 2011; 11: 36.
12. Office of the Surgeon General (US); Office on Smoking and Health (US). The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2004. Respiratory Diseases.
13. Henningfield J. Tobacco dependence treatment: scientific challenges; public health opportunities. *Tobacco Control.* 2000; 9: 3-10.
14. Barnoya J, Glantz S. Association of the California tobacco control program with declines in lung cancer incidence. *Cancer Causes Control.* 2004; 15: 689-95.
15. Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M. Effect of smoking reduction on lung cancer risk. *JAMA.* 2005; 294(12): 1505-10.
16. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 1985; 64: 111-26.
17. Rodgers PA, Vreman HJ, Dennery PA, et al. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. *Semin Perinatol.* 1994; 18(1): 2-10.

18. Vreman HJ, Wong RJ, Sanesi CA, *et al.* Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substances in rat tissue preparations by an iron-ascorbate system. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 1998; 76(12): 1057-65.
19. Brunnemann KD, Hoffmann D. Analytical studies on tobacco-specific nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit. Rev. Toxicol.* 1991; 21(4): 235-40.
20. Dalhamm T. In vivo and in vitro ciliotoxic effects of tobacco smoke. *Arch Environ Health.* 1970; 21: 633-4.
21. Trindade SHK, Mello Junior JF, Mion OG, *et al.* Methods for Studying Mucociliary clearance. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007; 73(5): 704-12.
22. Agius AM, Wake M, Pahor AL, *et al.* Smoking and middle ear ciliary beat frequency in otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol.* 1995; 115: 44-9.
23. Cohen NA, Zhang S, Sharp DB, *et al.* Cigarette smoke condensate inhibits transepithelial chloride transport and ciliary beat frequency. *Laryngoscope.* 2009; 119(11): 2269-74.
24. Kondo T, Shigeki O, Shimokata K. Smoking and smoking cessation in relation to all cause mortality and cardiovascular events in 25,464 healthy male Japanese workers. *Circulation Journal.* 2011; 75: 2885-92.
25. Fagerström KO, Heatherton TF, Kozlowski LT. Nicotine addiction and its assessment. *Ear Nose Throat J.* 1990; 69(11): 763-5.
26. American Thoracic Society. Standardization of spirometry: 1994 update. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152(3): 1107-36.

27. Duarte AA, Pereira CAC, Rodrigues SC. Validation of new brazilian predicted values for forced spirometry in caucasians and comparison with predicted values obtained using other reference equations. *J. Bras. Pneumol.* 2007; 33(5): 527-35.
28. Jarvis M, Belcher M, Vessey C, *et al.* Low cost carbon monoxide monitors in smoking assessment. *Thorax.* 1986; 41(11): 886-7.
29. Javirs MA, Hatch JP, Lamb RJ. Cut-off levels for breath carbon monoxide as a marker for cigarette smoking. *Addiction.* 2005; 100(2): 159-67.
30. Salah B, Dinh Xuan AT, Fouilladieu JL, *et al.* Nasal mucociliary clearance in healthy subjects is slower when breathing dry air. *Eur. Respir. J.* 1988; 1(9): 852-5.
31. Puchelle E, Aug F, Zahm JM, Bertrand A. Comparison of nasal and bronchial mucociliary clearance in young non smokers. *Clin Sci.* 1982; 62: 13-6.
32. Andersen IB, Camner P, Jensen PI, Philipson K, Proctor DF. A comparison of nasal and tracheobronchial clearance. *Arch Environ Health.* 1974; 29: 290-3.
33. Ducheteau GS, Gramans K, Ludera J, Merkus S. Correlations between nasal ciliary beat frequency and mucous transport rate in volunteers. *Laryngoscope.* 1985; 95: 854-9.34.
34. Stanley P, MacWilliams L, Greenstone M, Mackay I, Cole P. Efficacy of saccharin test for screening to detect abnormal mucociliary clearance. *Br J Dis Chest.* 1984; 78: 62-5.
35. Ferreira-Ceccato AD, Ramos EMC, Carvalho LCS, *et al.* Short terms effects of air pollution from biomass burning in mucociliary clearance of Brazilian sugarcane cutters. *Respir Medicine.* 2011; 105: 1766-8.

36. Ramos ECM, Toledo AC, Xavier RF, et al. Reversibility of impaired nasal mucociliary clearance in smokers following a smoking cessation programme. *Respirology*. 2011; 16: 849-55.
37. Puchelle E, Bentzmann S, Zahm J.M. Physical and Functional Properties of Airway Secretions in Cystic Fibrosis – Therapeutic Approaches. *Respiration* 1995; 62 (1):2-12.
38. Fahy J. V., Dickey BF. Airway Mucus Function and Dysfunction. *N Engl J Med* 2010; 363:2233-47
39. Dye JA, Adler KB. Occasional review Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. *Thorax*. 1994; 49(8): 825-34.
40. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(5): 372–7.
41. Stampfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(5): 377–84.
42. van Zyl-Smit R, Brunet L, Pai M, Yew W. The convergence of the global smoking, COPD, Tuberculosis, HIV, and respiratory infection epidemics. *Infect Dis Clin North Am*. 2010; 24(3): 693–703.
43. Adcock IM, Caramori G, Barnes PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights. *Respiration* 2011;81:265–284.
44. Cosio MG, Hale KA, Niewoehner DE. Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1980; 122(2): 265-21.
45. Zayas JG, Man GCW, King M. Tracheal mucus rheology in patients undergoing diagnostic bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141: 1107-13

46. Zhou H, Wang X, Brighton L, Hazucha M, Jaspers I, Carson JL. Increased nasal epithelial ciliary beat frequency associated with lifestyle tobacco smoke exposure. *Inhal Toxicol.* 2009; 21(10): 875-81.
47. Sloane PA, Shastry S, Wilhelm A, *et al.* A pharmacologic approach to acquired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in smoking related lung disease. *PLoS One.* 2012; 7(6): e39809.
48. Tamashiro E, Xiong G, Anselmo-Lima WT, *et al.* Cigarette smoke exposure impairs epithelial respiratory ciliogenesis. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 2009; 23(2): 117-22.
49. Slebos DJ, Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. *Respir. Res.* 2003; 4(7): 1-13.
50. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, *et al.* Comparison of exhaled and nasal nitric oxide and exhaled carbon monoxide levels in bronchiectatic patients with and without primary ciliary dyskinesia. *Thorax* 2004; 58(1): 68-72.
51. Middleton E, Morice A. Breath carbon monoxide as an indication of smoking habit. *Chest.* 2000; 117(3): 758-63.
52. Proença M, Xavier R, Ramos D, *et al.* Immediate and short term effects of smoking on nasal mucociliary clearance in smokers. *Rev. Port. Pneumol.* 2011; 17(4): 172-6.
53. Sanderberg A, Skold CM, Grunewald J, Eklund A, Wheelock AM. Assessing recent smoking status by measuring exhaled carbon monoxide levels. *PLoS One.* 2011;6(12):e28864.
54. Deveci SE, Deveci F, Açik Y, Ozan AT. The measurement of exhaled carbon monoxide in healthy smokers and nonsmokers. *Respir Med.* 2004; 98, 551–6.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Características demográficas e dados espirométricos dos indivíduos de acordo com a intensidade do consumo tabagístico. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão e mediana [Percentis 25-75].

Características	Não tabagistas (n = 24)	Tabagistas leves (n = 14)	Tabagistas moderados (n = 34)	Tabagistas intensos (n = 27)
Demográficas				
Gênero masculino (%)	30	38	41	48
Idade (anos)	50 \pm 11 47 [40-60]	51 \pm 15 55 [42-64]	49 \pm 7 50 [44-55]	46 \pm 8 48 [41-52]
IMC (Kg/m ²)	26 \pm 4 24 [23-30]	25 \pm 3 24 [22-27]	26 \pm 4 27 [23-29]	26 \pm 5 26 [24-28]
Valores Espirométricos				
VEF ₁ (%Prev.)	97 \pm 13 96 [85-104]	101 \pm 102 101 [89-112]	93 \pm 11 92 [85-105]	94 \pm 14 95 [82-109]
CVF (%Prev.)	93 \pm 11 93 [88-96]	97 \pm 11 96 [87-107]	96 \pm 11 96 [87-106]	102 \pm 15 103 [91-116]
VEF ₁ /CVF (%)	82 \pm 2 82 [80-83]	87 \pm 2 87 [84-90]	81 \pm 6 82 [78-85]	82 \pm 6 81 [77-83]

IMC= Índice de massa corporal; VEF₁ = Volume expiratório forçado no primeiro segundo;
CVF= Capacidade vitalforçada; Prev = previsto

Tabela 2. Comportamento tabagístico dos indivíduos de acordo com a intensidade do consumo de cigarros. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão e mediana [Percentis 25-75].

Características	Tabagistas leves (n = 14)	Tabagistas moderados (n = 34)	Tabagistas intensos (n = 27)
Comportamento tabagístico			
Anos de tabagismo	32 \pm 17 31 [18-48]	29 \pm 9 30 [23-35]	32 \pm 8 33 [27-38]
Índice anos/maço	17 \pm 10 18 [10-23]	27 \pm 11 24 [19-35]	59 \pm 44** 50 [40-68]
Cigarros/dia	9 \pm 1 10 [9-10]	18 \pm 3† 20 [15-20]	39 \pm 11** 40 [30-41]
Pontuação do Questionário Fagerstrom	4 \pm 2 3 [3-6]	5 \pm 2 5 [3-6]	6 \pm 3 6 [3-7]

** p<0.0001 *versus* tabagistas moderados e leves.

† p<0.0001 *versus* tabagistas leves.

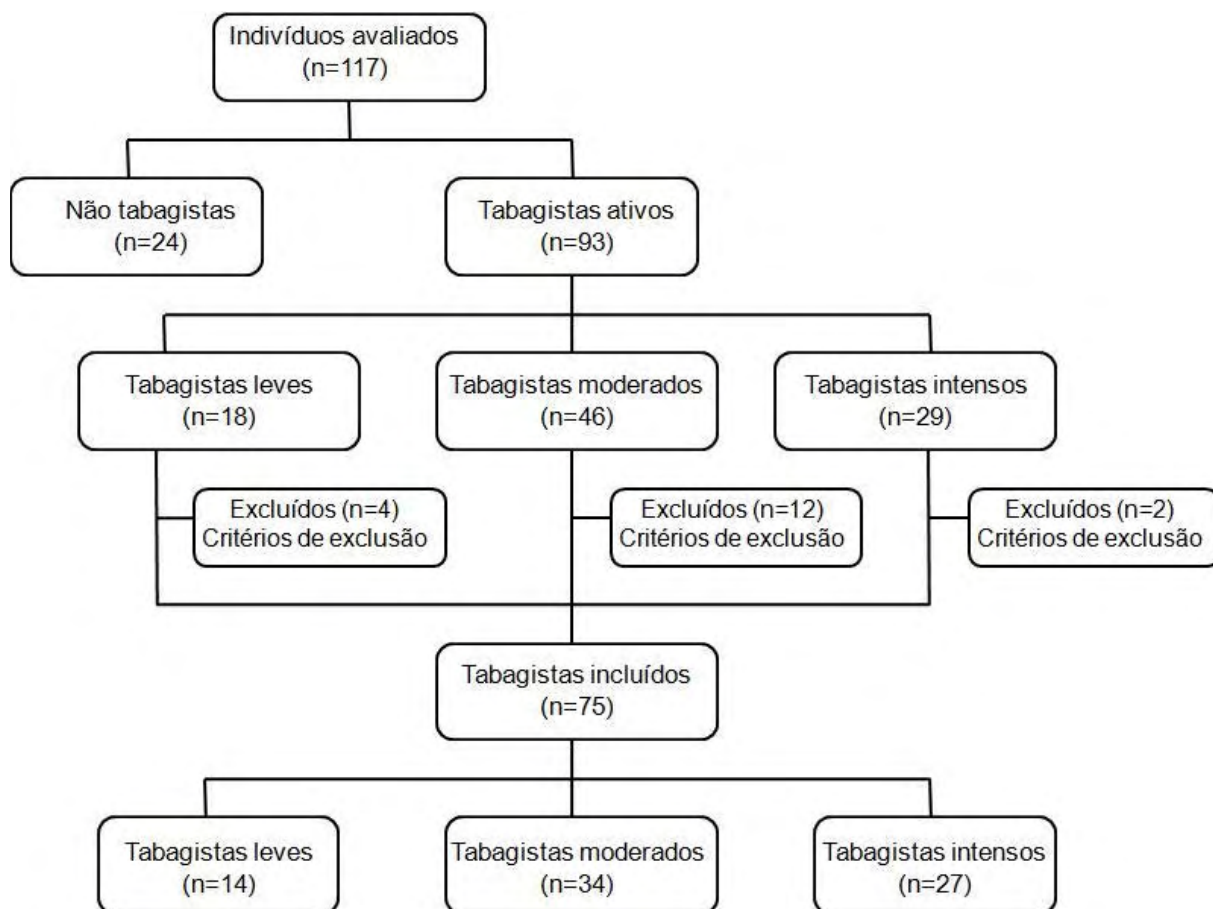


Figura 1. Diagrama de fluxo do estudo

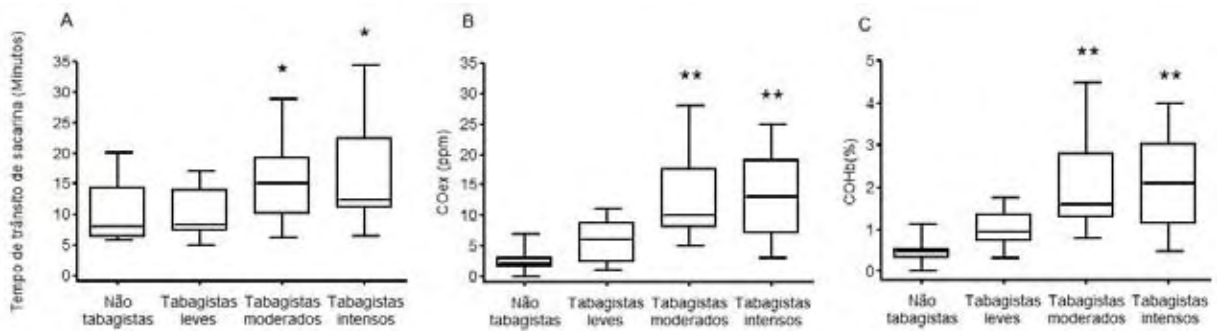


Figura 2. Tempo de trânsito de sacarina (A), monóxido de carbono exalado (B) e carboxihemoglobina (C) de não tabagistas (n=24), tabagistas leves (n=14), tabagistas moderados (n=34) e tabagistas intensos (n=27). Os dados estão apresentados como mediana (percentis 25% e 75%).*p=0.0001 e **p<0.0001: tabagistas moderados e intensos vs não tabagistas e tabagistas leves.

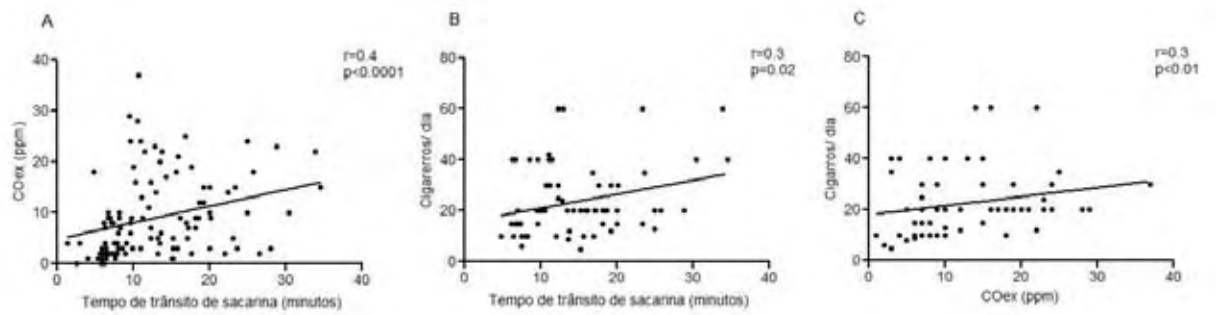


Figura 3. Foi observada correlação positiva entre os valores de (A) Tempo de trânsito de sacarina e COex ($r=0.4$; $p<0.0001$); (B) Tempo de trânsito de sacarina e Cigarros/dia ($r=0.3$; $p=0.02$); e (C) COex e Cigarros/dia ($r=0.3$, $p<0.01$).

Tabagistas com abstinência de 30 dias apresentaram redução sistêmica do marcador pró inflamatório primário, sem no entanto, apresentarem resposta anti-inflamatória. O prejuízo causado pelo tabagismo no transporte mucociliar está associado com a intensidade do consumo tabagístico.

Referências

1. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The mpower package. Geneva: Word Health Organization; 2008.
2. Reichert J, Araújo AJ, Gonçalves CMC, et al. Diretrizes para cessação do tabagismo. *J Bras Pneumol.* 2004; 30 (Supl 2).
3. Instituto Nacional do Câncer. Pesquisa Especial de Tabagismo (PETab) – Relatório Brasil (2008). ISBN 978-85-7318-175-3. 2010.
4. Haustein KO. Pharmacotherapy of nicotine dependence. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 2000; 38: 273-90.
5. Nunes E. Consumo do tabaco. Efeitos na saúde. *Rev Port Clin Geral.* 2006; 22: 225-44.
6. Floreani AA, Rennard SI. The role of cigarette smoke in the pathogenesis of asthma as a trigger for acute symptoms. *Curr Opin Pulm Med.* 1999; 5: 38-46.
7. Takizawa H, Tanaka M, Takami K et al. Increased expression of inflammatory mediators in small-airway epithelium from tobacco smokers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278: 906-13.
8. Wang H, Liu X, Umino T et al. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25: 772-9.
9. Kunz LI, Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Budulac SE, Timens W, van Wijngaarden S, et al. Smoking status and anti-inflammatory macrophages in bronchoalveolar lavage and induced sputum in COPD. *Respir Res.* 2011 Mar 22;12:34.
10. Urbankowski T, Hoser G, Domagała-Kulawik J. Th1/Th2/Th17 – related cytokines in the broncho alveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis: association with smoking. *Pol Arch Med Wewn.* 2012;122(7-8):320-5.

11. Freeman CM, Curtis JL, Chensue SW. CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8 cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity. *Am J Pathol.* 2007; 171: 767-76.
12. DeFranco A, Howard J, Janeway C, Littman D, Marrack P, Mitchison NA et al. Sistema Imune Adaptativo. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editores. *Biologia Molecular da Célula.* 2.ed. São Paulo: Artmed. 2006; 1363-1421.
13. Varella PPV, Wilma C. Forte WCN. Citocinas: revisão. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2001; 24(4):146-154.
14. Janice AD, Kenneth BA. Occasional review Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. *Thorax.* 1994; 49: 825-34.
15. Kreindler JL, Jackson AD, Kemp PA, Bridges RJ, Danahay H. Inhibition of chloride secretion in human bronchial epithelial cells by cigarette smoke extract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288:894-902.
16. Cohen NA, Zhang S, Sharp DB, et al. Cigarette smoke condensate inhibits transepithelial chloride transport and ciliary beat frequency. *Laryngoscope.* 2009; 119(11): 2269-74.
17. Elliott MK, Sisson JH, Wyatt TA. Effects of Cigarette Smoke and Alcohol on Ciliated Tracheal Epithelium and Inflammatory Cell Recruitment. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36: 452–9.
18. Ferri RG, Guilherme AZ, Guilherme A, Gregório IC. Análise do clearance mucociliar nasal e dos efeitos adversos do uso de CPAP nasal em pacientes com SAHOS. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004; 70(2): 150-5.

19. Stanley Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. *Thorax*. 1986; 41: 519-23.
20. Konrad FX, Schreiber T, Bretcht-Kraus D, Georgieff M. Bronchial Mucus Transport in chronic smokers and nonsmokers during general anesthesia. *Journal of Clinical Anesthesia*. 1993; 5(5): 375-380.
21. Verra F, Escudier E, Lebargy F et al. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151:630-634.
22. Agius AM, Smallman LA, Pahor AL. Age, smoking and nasal ciliary beat frequency. *Clin Otolaryngol* 1998; 23:227-230.
23. Ramos EMC, Toledo AC, Xavier RF, Fosco LC, Vieira RP, Ramos D, Jardim JR. Reversibility of impaired nasal mucociliary clearance in smokers following a smoking cessation programme. *Respirology*. 2011; 16: 849-855.
24. Chandler MA, Rennard SI. Smoking cessation. *Chest*. 2010; 137 (2).
25. Rigotti NA. Treatment of tobacco use and dependence. *N Engl J Med*. 2002; 346(7).

Anexo 1. Normas do Periódico *Respiratory Medicine* para submissão de artigo científico.

Guide for Authors

Respiratory Medicine (ISSN 0954-6111) is an internationally-renowned, clinically-oriented journal, combining cutting-edge original research with state-of-the-art reviews dealing with all aspects of respiratory diseases and therapeutic interventions, but with a clear clinical relevance. The journal is an established forum for the publication of phased clinical trial work at the forefront of interventional research. As well as full-length original research papers, the journal publishes reviews, correspondence, and short reports. The Journal also publishes regular supplements on areas of special interest.

Online Submission of Manuscripts

<http://ees.elsevier.com/yrmed>

Submission and peer review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors are guided stepwise through the entire process, and are kept abreast of the progress of their paper at each stage.

The system creates PDF version of the submitted manuscript for peer review, revision and proofing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, is conducted by e-mail.

Authors requesting further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/yrmed>. Authors are asked to bear in mind the guideline peer review and publication times available at the Respiratory Medicine journal homepage: click here for [Journal News](#).

Peer Review

Submissions are allocated to a handling editor, typically an Associate Editor. Should the paper be considered suitable for peer review, appropriate reviewers will be recruited. Authors are required to provide the name and full contact details of 2 potential reviewers, though choice of reviewers is at the discretion of the handling editor.

The final decision-making responsibility lies with the handling editor, who reserves the right to reject the paper despite favourable reviews depending on the priorities of the journal.

For full details on the peer review process and current peer review decision times please click here for [Journal News](#).

Cover letter

Corresponding authors must provide a cover letter which includes statements answering the following questions:

- Has the work been seen and approved by all co-authors?
- How is the work clinically relevant, and how does it add to existing research?

- Have papers closely related to the submitted manuscript been published or submitted for publication elsewhere? If so please provide details.

Failure to provide a cover letter addressing each of the questions above will result in the paper being returned to the author. The cover letter must be uploaded as a separate submission item.

For queries, please contact the journal editorial office directly:
respiratorymedicine@elsevier.com

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

The potential for conflict of interest exists when an author (or the author's institution), reviewer or editor has financial or personal relationships that may inappropriately influence his or her actions. Editors and reviewers for the journal are responsible for disclosing to the Chief Editor any personal or financial relationship that may bias their work during the peer review process.

Authors are specifically asked to reflect on financial conflicts of interest (such as employment, consultancy, stock ownership, honoraria and paid expert testimony) as well as other forms of conflict of interest, including personal, academic and intellectual issues.

For the conflict of interest statement all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. The Conflict of Interest Statement is a mandatory submission item: authors are required to submit the statement to proceed with their submission. Conflict of Interest statements will typically be published within the body of the article, and will appear preceding the references section. All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the

decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Randomised controlled trials

All randomised controlled trials submitted for publication in Respiratory Medicine should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. Respiratory Medicine has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration. Further information can be found at <http://www.icmje.org>.

Disclosure of Clinical Trial Results

When submitting a Clinical Trial paper to the journal via the online submission system please select *Clinical Trial Paper* as an article type.

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors , the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (eg, investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Supplementary material

Respiratory Medicine accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For

more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Ethics

Work on human beings that is submitted to *Respiratory Medicine* should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Copyright

Accepted papers become the copyright of the Journal and are accepted on the understanding that they have not been published, are not being considered for publication elsewhere and are subject to editorial revision. If papers closely related to the submitted manuscript have been published or submitted for publication elsewhere, the author must state this in their cover letter. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will

ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>. Or email healthpermissions@elsevier.com.

Manuscript submission checklist

Authors should ensure they have uploaded the following as separate items in order for the editorial office to process their submission. Failure to provide any of the mandatory items below will result in the manuscript being returned to the author.

- Cover letter (mandatory)
- Abstract (including clinical trial registration number where appropriate)
(mandatory)
- Conflict of Interest Statement (mandatory) Manuscript including ethics statement as appropriate (mandatory)
- Artwork (optional)
- Supplementary files eg. datasets, video files (optional)
- Permissions letters (As necessary, see below)
- Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart as appropriate

Reviews

The journal welcomes submission of state-of-the-art reviews on important topics with a clinical relevance. Potential review authors are encouraged to contact the Deputy Editor Dr N. Hanania hanania@bcm.tmc.edu in advance with their review proposals.

Case Reports (Respiratory Medicine Case Reports)

All case reports will henceforth no longer be considered for publication in Respiratory Medicine, but instead for the sister publication **Respiratory Medicine Case Reports**. *Please note that this is a separate publication to the regular journal. Case reports may be submitted for consideration for Respiratory Medicine Case Reports via the same online submission site as the regular journal, as described below. Respiratory Medicine Case Reports is an open access journal and all authors will be required to pay a £250 processing fee to cover the costs of publishing the article, which authors will be required to pay once an article has passed peer review.*

Preparing your manuscript

Authors are asked to bear in mind the following additional points before entering the submission process.

Format and Structure

Most text formats can be accommodated, but Microsoft Word is preferable. In general, articles should conform to the conventional structure of Summary, Introduction, Methods, Results, Discussion and References.

Title

Your title page, should give the title in capital letters (not exceeding 100 letters), a running title (not exceeding 50 letters) and the authors' names (as they are to appear), affiliations and complete addresses, including postal (zip) codes. The author and address to whom correspondence should be sent must be clearly indicated. Please supply telephone, fax and e-mail numbers for the corresponding author.

Abstract

An abstract of your manuscript summarizing the content, at a maximum of 250 words, should be provided as a separate submission item.

Reference Format

Manuscripts should use the 'Embellished Vancouver' style for references, as follows:

Text: Indicate references by superscript numbers in the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000; **163**:51–9.

Reference to a book:

2. Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age. New York: E- Publishing Inc; 1999, p. 281–304. Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34), see also

http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html.

Figures

Figures of good quality should be submitted online as a separate file. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, consult: <http://www.elsevier.com/authors>. Permission to reproduce illustrations should always be obtained before submission and details included with the captions.

Tables

Tables should be submitted online as a separate file, bear a short descriptive title, and be numbered in Arabic numbers. Tables should be cited in the text.

Keywords

A list of three to six keywords should be supplied: full instructions are provided when submitting the article online.

Units and Abbreviations

These should be given in SI units with the traditional equivalent in parentheses where appropriate. Conventions for abbreviations should be those detailed in Units, Symbols, and Abbreviations, available from the Royal Society of Medicine.

Language Editing

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our [Terms and Conditions](#).

Brief Communications

These should be submitted as detailed above but should not exceed 1000 words, and may normally contain only one illustration or table. Brief communications containing new information may be selected for rapid peer review and publication at the discretion of the editor and editorial board.

Permissions Information

If illustrations are borrowed from published sources, written permission must be obtained from both publisher and author, and a credit line giving the source added to the legend. If text material totalling 250 to 300 words, or any tables, are borrowed verbatim from published sources, written permission is required from both publisher and author. With shorter quotations, it is sufficient to add a bibliographic credit. Permission letters for reproduced text or illustration must accompany the manuscript. If you have been unable to obtain permission, please point this out.

Fast-track Publication

The journal aims for prompt publication of all accepted papers. Submissions containing new and particularly important data may be fast-tracked for peer review and publication; this is a limited facility and is strictly at the discretion of the Chief Editor.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author which they are requested to correct and return within 48 hours. Only minor corrections are acceptable at this stage. If we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from [Adobe](#). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the [Adobe](#) site. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an

e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed visit: <http://www.elsevier.com/authors>. There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements

as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit

[http://www.elsevier.com/fundingbodies.](http://www.elsevier.com/fundingbodies)

Editorial office

To contact the Respiratory Medicine editorial office, please email respiratorymedicine@elsevier.com. We aim to respond to all queries rapidly.

Anexo 2. Normas do Periódico Respiration para submissão de artigo científico.

Respiration (0025-7931)

Submission

Manuscripts written in English should be submitted online or as an e-mail attachment (the preferred word-processing package is MS-Word) to the Editorial Office:

res@karger.com

Editorial Office 'Respiration'

S. KARGER AG

P.O. Box

CH-4009 Basel (Switzerland)

Tel. +41 61 306 1357

Fax +41 61 306 1434

All manuscripts must be accompanied by a covering letter signed by all authors. Assurance should be given that the manuscript is not under simultaneous consideration by any other publication. The preferred word processing package is Word for Windows®. Presentation of manuscripts should conform with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (see N Engl J Med 1997;336:309–315).

Conditions

All manuscripts are subject to an editorial process involving the Editor-in-Chief, an Associate Editor and reviewers. Notification can be expected within two months from the date of receipt. Submission of an article for publication implies the transfer of the

copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of 'Respiration' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

Clinical Trials: In accordance with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal requires that all clinical trials having commenced on or after 1 July 2005 be registered in a public trial registry accessible free of charge. Please consult http://www.icmje.org/index.html#clin_trials for further details. 'Respiration' has implemented the expanded definition stating that 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example, drugs, surgical procedures, devices, behavioral treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

The journal consists of the following sections:

1. Thematic Review Series
2. Editorials
3. Clinical Investigations
4. Interventional Pulmonology
5. Basic Science Investigations
6. New Drugs in Respiratory Medicine
7. Technical Notes
8. The Eye Catcher
9. Novel Insights from Clinical Practice
10. What Is Your Diagnosis?

11. Reviews
12. Guidelines
13. The Opinion Corner
14. Clinico-Pathological Conferences
15. Letters to the Editor
16. Congress Calendar

Reviews: Invited reviews, if accepted, are not subject to page charges. Unsolicited reviews may also be submitted for consideration.

Letters addressed to the Editor are encouraged if they directly concern articles previously published in this journal and clinical subjects related to the matters discussed. The editor reserves the right to submit copies of such letters to the authors of the articles concerned prior to publication in order to permit them to respond in the same issue of the journal. But letters on general scientific or medical subjects in respiratory medicine are also welcome. Letters to the Editor should be no longer than one printed page.

Eye Catchers: Maximum 1 printed page. Text may not exceed 250 words to allow sufficient space for pictorial material, which is the main object of an Eye Catcher. Maximum 2 references and 2–5 keywords.

Novel Insights from Clinical Practice (formerly Case Reports): Maximum 7 authors. The publication space available for case reports is very limited. The journal only considers case reports with significant new insights or with an extremely unusual and memorable course. Highlighted boxes containing one or two bullet points on 'Established facts' (what is already known) and 'Novel insights' (what new information has been gained) are required and should be placed on the first page of the report. These should be selected so as to reinforce the novelty of the clinical observation. The text per box should be limited to 1–2 very short sentences. The manuscript should be presented with an abstract (unstructured, max. 200 words), followed by introduction, case report and discussion. Maximum 3 figures.

What Is Your Diagnosis?: Select catchy title not disclosing the diagnosis. Page 1: Case report and 1–2 illustrations and the question 'What Is Your Diagnosis'. Page 2: The diagnosis followed by a short description of what diagnostic procedures were done to reach the diagnosis and the discussion with references. Maximum 15 references and include 3–5 keywords.

Guidelines: Consensus Guidelines are welcome from working groups to provide guidance in key and emerging areas in all fields of respiratory medicine. Such guidelines are also subject to a reviewing process.

Patient Consent

This is required for ALL articles containing personal information about the patient submitted for publication in the following sections:

Novel Insights from Clinical Practice

What Is Your Diagnosis?

Eye Catcher

Signed patient consent (please use this [Patient Consent Form](#)) must be obtained from the patient, guardian or next of kin (or a statement that the patient was not alive at the time of writing) and submitted along with the manuscript.

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation.

If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

Arrangement

Pages should be numbered throughout the manuscript text.

Title page: The first page of each paper should indicate the title, the authors' names, the institute where the work was conducted, and a short title for use as running head.

Full address: The exact postal address of the corresponding author complete with postal code must be given at the bottom of the title page. Please also supply phone and fax numbers, as well as e-mail address.

Key words: For indexing purposes, a list of 3–7 key words is essential.

Abstract: Each paper needs an abstract of up to 250 words. Abstracts of papers submitted for publication in the sections *Clinical Investigations*, *Basic Science Investigations*, *Interventional Pulmonology*, and *Technical Notes* should be structured as follows:

Background: What is the major motive that prompted the study?

Objectives: What is the purpose of the study?

Methods: How was the study done?

Results: Most important findings.

Conclusions: Most important conclusions.

Introduction: What is the main question? State your considerations leading to the formulation of this question.

Material and Methods: Prior approval of an Institutional Review Board (IRB) is required for all investigations involving human subjects and animals. Animal experimentation must be performed according to the Helsinki Declaration.

Study design: Provide a short survey of the tests or experiments. Include the independent variable(s) manipulated, the dependent variable(s) measured and all controls.

Methods: Describe methods and apparatus in detail. Provide references and brief description of methods already published. Identify drugs and chemicals, including generic name, dosage and administration. Describe the pre-study condition of patients or animals.

Analysis: Define the variables. Use statistical analysis that is appropriate for the study. Describe statistical methods used for each analysis; provide references for tests that are not well known.

Results: A concise report of important results only. Use figures and tables for the presentation of data; summarize the most important observations in the text. Start and end dates of the study must be indicated (from ... to, preferably exact dates, but at least months and year[s]).

Discussion: Summarize main results and make sure you can answer the question asked in the introduction, briefly supporting the answer with the relevant results. Explain and defend the answer, comment on contradictory or unexpected results and discrepancies with previous findings. Elaborate on new and important aspects of the study.

Acknowledgements: Use this section to name persons who have contributed to the article, but whose contributions do not justify authorship.

Footnotes: Avoid footnotes. When essential, they are numbered consecutively and typed at the foot of the appropriate page.

Tables and Illustrations: Tables and illustrations (both numbered in Arabic numerals) should be prepared on separate sheets. Tables require a heading and figures a legend, also prepared on a separate sheet. Due to technical reasons, figures with a screen background should not be submitted. When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm) or provide crop marks. Each illustration must be labelled with its number and the first author's name. b/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800–1,200 dpi. Figure files must not be embedded in a document file but submitted separately (see detailed instructions at [Online Submission Instruction](#)).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 800.00 per page.

References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as 'unpublished data' and not be included in the reference list. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, please cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (www.icmje.org).

Examples

(a) Papers published in periodicals:

Sun J, Koto H, Chung KF: Interaction of ozone and allergen challenges on bronchial responsiveness and inflammation in sensitised guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:191–195.

(b) Papers published only with DOI numbers:

Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) Monographs:

Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*, ed 3, revised. Basel, Karger, 1996.

(d) Edited books:

Parren PWHI, Burton DR: Antibodies against HIV-1 from phage display libraries: Mapping of an immune response and progress towards antiviral immunotherapy; in Capra JD (ed): *Antibody Engineering*. *Chem Immunol*. Basel, Karger, 1997, vol 65, pp 18–56.

Reference Management Software: Use of EndNote is recommended for easy management and formatting of citations and reference lists.

SI Units

Since the United States of America and other countries outside Europe where 'Respiration' is read have not accepted the SI System, authors using SI Units should add the conventional units in parentheses, for example: $pO_2 = 10 \text{ kPa (75 mm Hg)}$.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).

Page Charges

There are no page charges for papers of 4 or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). Each additional complete or partial page is charged to the author at CHF 325.00. The allotted size of a paper is equal to approx. 12 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

*Author's Choice*TM

Karger's Author's ChoiceTM service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits your manuscript on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publication. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium Author's ChoiceTM service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's Author's ChoiceTM feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the corresponding author and should be

returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author.

E-pub First

All articles are published electronically ahead of print with a DOI number and are supplemented later with the definite reference of the printed version. The articles become available immediately after the authors' approval to publication, with the added advantage of being citable much earlier than in print. Authors can influence the time of appearance by promptly returning the proofs.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.

Financial Disclosure and Conflicts of Interest

Authors must disclose any and all financial involvement in any organization with a direct financial interest in the subject discussed in the submitted manuscript.

Any conflict of interest for a given manuscript must be dealt with according to the statement of the International Committee of Medical Journal Editors (the 'Vancouver Group') (Lancet 1993;341:742).