

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

CRISTIANE CENACHI COELHO

**Análise fotoacústica do tempo de solubilização do muco brônquico em
pacientes portadores de fibrose cística colonizados por diferentes bactérias**

São José dos Campos – SP
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cristiane Cenachi Coelho

Análise fotoacústica do tempo de solubilização do muco brônquico em pacientes portadores de fibrose cística colonizados por diferentes bactérias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roxo Barja
Co-orientador: Prof. Dr. Luis Vicente Franco de Oliveira

São José dos Campos – SP
2006

C615a

Coelho, Cristiane Cenachi

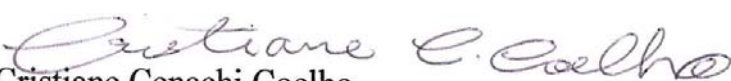
Análise do tempo da solubilização do muco brônquico em pacientes portadores de fibrose cística colonizados por diferentes bactérias/ Cristiane Cenachi Coelho. São José dos Campos: UNIV AP, 2006,

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Fibrose cística 2. *Staphylococcus aureus* 3. *Pseudomonas aeruginosa* 4. Soluções isotônicas 4. Muco 5. Brônquios I. Barja, Paulo Roxo, Orient 11. Oliveira, Luís Vicente Franco. Co-Orient. 111. Título

CDU: 616.233

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica desde que citada a fonte.


Aluna: Cristiane Cenachi Coelho

São José dos Campos, 22 de Novembro de 2006

**“ANÁLISE FOTOACÚSTICA DO TEMPO DE SOLUBILIZAÇÃO DE MUÇO BRÔNQUICO
EM PACIENTES PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA COLONIZADOS POR DIFERENTES
BACTÉRIAS”**

Cristiane Cenachi Coelho

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **LUIS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **PAULO ROXO BARJA** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **HUEDER PAULO MOISÉS DE OLIVEIRA** (UNIVAP) 

Prof. Dra. **NAOMI KONDO NAKAGAWA** (UNICID) 

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Paulo Roxo Barja e ao Prof. Dr. Luís Vicente Franco de Oliveira, pela contribuição com seus conhecimentos e incentivo.

Ao Evanirso, pelo incentivo e colaboração durante toda realização deste trabalho.

À AMAM e aos pacientes portadores de fibrose cística, que se disponibilizaram a participar e a oferecer sua contribuição.

À coordenação e aos colegas da Puc Minas Betim e do Uni-BH, que me auxiliaram nos momentos em que precisei me ausentar das minhas atividades acadêmicas. Em especial, Isa, Gisele, Ivana e Ingrid.

À minha família, pelo incentivo incondicional.

Aos amigos do mestrado, pelos vários momentos que compartilhamos juntos durante quase dois anos.

A todos, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta etapa de trabalho.

“Só possuímos aquilo que recebemos e transformamos, aquilo
que tornamos, graças aos outros e contra eles”.

André Comte-Sponville
(Petit Traité des grandes vertus)
(Pequeno tratado das grandes virtudes)

RESUMO

“Análise do tempo de solubilização do muco brônquico em pacientes portadores de fibrose cística colonizados por diferentes bactérias”

A fibrose cística é uma doença que resulta na alteração do transporte iônico através do epitélio respiratório. A desidratação da secreção pulmonar conduz à alteração do *clearance* mucociliar e à colonização do trato respiratório. *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são os microorganismos freqüentemente detectados nas secreções pulmonares desses pacientes. O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de solubilização do muco brônquico em pacientes fibrocísticos, colonizados por diferentes bactérias, em solução salina isotônica, através da técnica fotoacústica. As amostras foram divididas em três grupos de acordo com a cultura do escarro: grupo sem colonização (grupo I), colonizado por *Staphylococcus aureus* (grupo II) e colonizado por *Pseudomonas aeruginosa* (grupo III). O esquema experimental incluiu uma lâmpada do tungstênio de 250W como fonte de luz e uma célula fotoacústica de duas fases. A luz foi modulada mecanicamente em 23 Hz. As medidas foram realizadas a cada cinco minutos com um tempo total de uma hora e quinze minutos, utilizado um volume de 0.1mL de secreção. Nos primeiros quinze minutos, as amostras foram nebulizadas com solução salina isotônica. Vinte e seis amostras foram analisadas (grupo I=7; grupo II=9; grupo III=10). Os parâmetros estudados foram: sinal fotoacústico relativo pós-solubilização, tempo de pico da velocidade de solubilização, intervalo de tempo de solubilização. Em relação à amplitude do sinal fotoacústico relativo pós-solubilização ocorreu aumento médio de 12% no grupo I, 7% no grupo II e não ocorreu aumento no grupo III. Também foi observado aumento significativo de solubilidade para o grupo I ($p<0,05$) e grupo II ($p<0,10$), sendo descartado para o grupo III. Os resultados obtidos para tempo de pico da velocidade de solubilização foram: 10 (± 2) para grupo I, 23 (± 4) para grupo II e 9.4 (± 0.8) para grupo III. Esses valores podem ser atribuídos às diferenças no processo de solubilização entre os grupos. Não foi observada nenhuma diferença entre o grupo I e grupo III porque o processo de solubilização no grupo III não foi eficaz com a utilização da solução salina isotônica. A solubilização não satisfatória no grupo III explica também o valor irreal de 0.2 (± 0.1) para o intervalo de tempo de solubilização nesse grupo, quando comparado aos valores do grupo I e grupo II: 4 (± 2) e 2.5 (± 0.8), respectivamente. O grupo I mostrou o maior valor para esse parâmetro, provavelmente, porque as amostras sem colonização tiveram menos alterações de solubilidade. Esses resultados demonstram que a técnica fotoacústica pode ser empregada com sucesso na análise de processos de solubilização do muco brônquico, colonizado por diferentes bactérias.

Palavras chave: Muco brônquico, fibrose cística, técnica fotoacústica, solução salina isotônica, solubilização.

ABSTRACT

“The analysis of bronchial secretion solubility behavior in cystic fibrosis patients with different bacterial colonization”

Cystic fibrosis is a disorder which results in aberrant ion transport across the respiratory epithelium. The observed dehydration of airway secretion leads to the decrease of mucociliary clearance and colonization of respiratory tract. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are the pathogens first detected in respiratory secretions of these patients. The aim of this study was to evaluate the solubility behavior of the bronchial secretion associated to isotonic saline solution in patients with cystic fibrosis with different bacterial colonization. This was accomplished using the photoacoustic technique. The samples collected were divided in three groups according to the sputum culture analysis: group without colonization (group I), colonized by *Staphylococcus aureus* (group II) and colonized by *Pseudomonas aeruginosa* (group III). The experimental setup included a 250W tungsten lamp as the light source and a double-faced PA cell. Light was mechanically modulated at 23 Hz. Measurements were performed each five minutes, up to a total time of one hour and fifteen minutes with a volume of 0.1mL of the bronchial secretion. During the first fifteen minutes, the samples were nebulized with isotonic saline solution. Twenty-six samples were analyzed, (group I=7; group II=9; group III=10). The variables analyzed were: relative photoacoustic signal after solubilization, solubilization characteristic time and solubilization period. About the amplitude of relative photoacoustic signal after solubilization occurred a mean increase of 12% in group I, 7% in group II and technically did not occurred increase in group III. Also was observed significant increase of solubility for group I ($p<0.05$) group II ($p<0.10$) and discarded for group III. The results obtained for solubilization characteristic time were: 10 (± 2) for group I, 23 (± 4) for group II and 9.4 (± 0.8) for group III. These different values are attributed to differences in the kinetics of the solubilization process for these groups. There were no statistically significant differences between the groups group I and group III; however, the solubilization process in group III was not effective, leading to the conclusion that the isotonic saline solution employed was not able to help solubilization in this group. The unsatisfactory solubilization for group III also explains the unreal value of 0.2 (± 0.1) for solubilization period in group III, while for group I and group II the results were 4 (± 2) and 2.5 (± 0.8), respectively. Group I showed the highest value for this variable, probably because samples without colonization had less alterations in solubility. These results demonstrate that the photoacoustic technique can be successfully employed in the analysis of solubilization processes of bronchial secretion with different bacterial colonization.

Key words: Bronchial mucus, cystic fibrosis, photoacoustic technique, isotonic saline solution, solubilization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático das glândulas exócrinas em sujeitos normais e em pacientes portadores de fibrose cística.....	26
Figura 2: Célula fotoacústica de duas faces.....	53
Figura 3: Desenho esquemático do corte transversal da célula fotoacústica de duas faces....	53
Figura 4: Arranjo experimental utilizando a célula fotoacústica com duas faces.....	54
Figura 5: Modelo da curva sigmoidal com os parâmetros de ajuste.....	57
Figura 6: Curvas médias de ajuste para as medidas fotoacústicas nos grupos.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sinal relativo pós-solubilização (S_R), tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0) e intervalo de tempo de solubilização (dt) dos grupos.....	60
Tabela 2: Valor de p para teste t pareado do valor de S_R	61
Tabela 3: Intervalo de tempo de solubilização (dt) dos grupos.....	62
Tabela 4: Tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0) dos grupos.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenosina trifosfato

CFTR: proteína reguladora da condutância transmembranar da fibrose cística

Cl⁻: íon cloro

DNA: ácido desoxirribonucléico

FC: fibrose cística

H₂O: água

mL: mililitros

MHz: mega hertz

NaCl: cloreto de sódio

Na⁺: íon sódio

VEF₁: Volume expiratório forçado de primeiro segundo

W: watts

V: volts

LISTA DE SÍMBOLOS

μm : micrômetro

K : energia cinética

p : momento linear

m : massa

α : difusividade térmica

k : condutividade térmica

T : temperatura

t : tempo

x : distância de propagação

ε : efusividade térmica

ρ : densidade

c : calor específico

μ : comprimento de difusão térmica

f : frequência de modulação

S_R : sinal fotoacústico relativo pós-solubilização

t_0 : tempo de pico da velocidade de solubilização

dt : intervalo de tempo de solubilização

PA : amplitude do sinal fotoacústico

A_1 : amplitude do sinal fotoacústico inicial

A_2 : amplitude do sinal fotoacústico final

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	21
4 FIBROSE CÍSTICA	23
4.1 Generalidades	24
4.2 Aspectos genéticos e conseqüências das anomalias de transferência iônica nas vias aéreas	25
5 APARELHO MUCOCILIAR	29
5.1 Aspectos morfofuncionais	30
5.3 Propriedades reológicas do muco brônquico	34
5.4 Regulação da depuração mucociliar na saúde e na doença	35
5.5 Métodos de avaliação da transportabilidade do muco brônquico e estudos de suas propriedades reológicas	36
6 AEROSSOLTERAPIA	39
7 PATÓGENOS NA FIBROSE CÍSTICA	42
8 FOTOACÚSTICA	47
9 MATERIAIS E MÉTODOS	51
9.1 Cuidados Éticos	52
9.2 Métodos de Avaliação	52
9.2.1 Coleta do muco brônquico	52
9.2.2 Fotoacústica	53
9.3 Amostra	54
9.4 Situação Experimental	55
9.5 Fluxograma Experimental	56
9.6 Parâmetros de ajuste e análise estatística	56
10 RESULTADOS	59
11 DISCUSSÃO	63
12 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	79
ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	80
ANEXO B: Termo de Consentimento Livre Esclarecido	81

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O aparelho respiratório do ser humano possui uma grande superfície de interação com o meio externo. Entretanto, no ar inspirado existem poluentes causadores de diversas doenças. Geralmente, em condições fisiológicas, as partículas com diâmetro superior a 10 μ m ficam retidas na nasofaringe, as com diâmetro entre 3 e 10 μ m depositam-se no compartimento traqueobrônquico e as entre 0.3 e 3 μ m têm maior chance de chegar aos alvéolos. Portanto, vários mecanismos de defesa atuam no aparelho respiratório, na tentativa de impedir a ação de agentes agressores (HEYDER, 2004).

O sistema mucociliar é considerado um desses mecanismos. É constituído pelo líquido periciliar, cílios e muco brônquico. Esses fluidos são produzidos por células mucosas e serosas que são células secretoras das glândulas submucosas e também por células mucosas, serosas e de Clara. Estes três tipos de células são responsáveis pela formação do epitélio das vias aéreas e juntas formam uma camada pseudoestratificada sendo que a célula de Clara é a única célula formadora do epitélio e secretora de muco que faz parte da porção respiratória deste epitélio. Portanto, o número de células mucosas e serosas tende a diminuir em direção ao território de troca gasosa dos pulmões, já o número de células de Clara aumentam. A estrutura básica destas células inclui numerosos grânulos de secreção, sistema de Golgi, retículo endoplasmático bastante desenvolvido e presença de microvilosidades na superfície. O produto de sua secreção tem função de servir de veículo para absorção e transporte das substâncias e lise de microorganismos. Entram na composição do fluxo, que reveste as vias aéreas, substâncias antioxidantes, tampões, imunoglobulinas e enzimas capazes de interagir com microorganismos. Esse sistema é responsável pelo transporte diário de um volume de muco de aproximadamente 10mL em indivíduos normais. (KNOWLES; BOUCHER, 2002).

O transporte do muco brônquico e das substâncias englobadas por ele é realizado através de movimentos na direção de orofaringe, ou seja, das vias aéreas periféricas para as centrais, com intuito de manter a integridade das vias aéreas inferiores. A hipersecreção de muco ocorre para a proteção e está relacionada diretamente com situações de agressão ao sistema respiratório através de partículas inaladas (RUBIN, 2002; SOOD *et al.*, 2003)

Durante os processos de infecção das vias aéreas podem ser encontrados no muco brônquico grande número de glicoproteínas mucosas e serosas, produtos inflamatórios incluindo derivados de neutrófilos, ácido desoxirribonucléico (DNA) e filamentos de actina, além de bactérias, enzimas e debris de células. Essas alterações contribuem para purulência, aumento da viscosidade e diminuição da elasticidade do muco tornando-o menos transportável (WIDDICOMBE; WIDDICOMBE, 1995; RUBIN, 2002).

Nos indivíduos normais, o muco não permite que as macromoléculas atinjam as vias aéreas inferiores e possui propriedades bactericidas. Entretanto, isso não ocorre em algumas doenças como, por exemplo, a fibrose cística. Além disso, os pacientes portadores de fibrose cística também possuem anormalidades no transporte de eletrólitos e infecção crônica por microorganismos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Tudo isso resulta em alterações importantes nas propriedades físico-químicas do muco, desidratando-o, tornando-o mais espesso e viscoso. Esse muco estagnado na árvore respiratória determina fenômenos obstrutivos, predispondo a mais infecção (WILSON; DOWLING; JACKSON, 1996; GOVAN, 2000; TARRAN, 2004).

Várias medidas terapêuticas são utilizadas com esses pacientes na tentativa de fluidificação das secreções anormais, para facilitar sua remoção. Dentre elas destacam-se as

técnicas e recursos fisioterapêuticos associados a fármacos (KING *et al.*, 1997; PAUL *et al.*, 2004).

Agentes mucoativos como, por exemplo, as soluções salina isotônica (0,9% de NaCl) e hipertônica (NaCl > 0,9%), são utilizados como agentes inalatórios pela capacidade de modificar a produção de muco, sua secreção, natureza, composição e/ou interações com o epitélio mucociliar em diversas doenças. A utilização dessas soluções pode promover a solubilização do muco. Esse processo ocorre através da diminuição da concentração do material pela hidratação dos íons e, conseqüentemente, pelo aumento do número de moléculas de água imediatamente próximas (POPOV *et al.*, 1995; PIZZICHINI *et al.*, 1999; CATALDO *et al.*, 2001).

Em nível microscópico, as propriedades de difusão térmica, condução de calor e viscosidade do muco possuem mecanismos análogos de funcionamento. No caso da condução de calor, ocorre a transmissão de energia cinética (K) entre as moléculas. No caso da viscosidade, ocorre transmissão do momento linear (p) (RESNICK; HALLIDAY, 2003). O fato de que a energia cinética K está relacionada diretamente momento linear ($K=p^2/2m$) indica que as propriedades térmicas e reológicas de um mesmo material estão intimamente relacionadas.

Existem várias técnicas para estudar as propriedades térmicas da matéria, dentre elas a técnica fotoacústica que é baseada no efeito fotoacústico, o qual corresponde à geração de som quando um material absorve luz pulsada numa câmara fechada. A amplitude do som gerado depende das propriedades térmicas e ópticas do material absorvedor. Os materiais

estudados através dessa técnica podem ser líquidos, cristais, gases e materiais biológicos. (ROSENCWAIG, 1982; VARGAS *et al.*, 1988).

Não existem estudos prévios que avaliem a solubilização do muco brônquico através da técnica fotoacústica, em pacientes portadores de fibrose cística, colonizados por diferentes bactérias.

2. JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Pacientes portadores de fibrose cística que apresentam infecções pulmonares recorrentes devido ao acúmulo de secreção e colonização por microorganismos evoluem com destruição importante do parênquima pulmonar, piora do prognóstico e expectativa média de vida (WAGENER; HEADLEY, 2003). Diversos estudos descrevem as alterações de viscosidade do muco brônquico de pacientes portadores de fibrose cística, colonizados por diferentes bactérias (GILLIGAN, 1991; BENTZMANN; ROGER; PUCHELLE, 1996; REIS; DAMACENO, 1998; SADOWSKA *et al.*, 2002). Entretanto, embora existam estudos, avaliando reologia e viscoelasticidade desse tipo de amostra, a literatura carece de estudos que avaliem comparativamente a solubilização desse muco, colonizado por diferentes bactérias.

Neste trabalho, propõe-se uma metodologia para avaliação direta da cinética de solubilização, utilizando a técnica fotoacústica empregada com frequência crescente nas áreas biológica e biomédica (BARJA *et al.*, 2001; ANJOS *et al.*, 2005; ROMPE *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005). Desse modo, o presente estudo se torna de fundamental importância para a verificação da aplicabilidade dessa técnica na avaliação da solubilização do muco brônquico e de sua sensibilidade para determinação do tempo e período de solubilização, de acordo com a presença ou não de colonização e do tipo de bactéria.

3. OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- Verificar a ocorrência de solubilização de muco brônquico, utilizando-se solução salina isotônica em portadores de fibrose cística sem colonização, ou colonizados por diferentes bactérias;
- Avaliar o tempo de solubilização do muco brônquico, utilizando-se solução salina isotônica, em portadores de fibrose cística sem colonização, ou colonizados por diferentes bactérias;
- Comparar a cinética de solubilização do muco brônquico em portadores de fibrose cística sem colonização, ou colonizados por diferentes bactérias, utilizando-se solução salina isotônica como agente solubilizador.

4 FIBROSE CÍSTICA

4.1 Generalidades

A Fibrose Cística (FC) ou mucoviscidose é de uma afecção genética, sistêmica, monogênica e com um padrão de herança autossômico recessivo, ou seja, são necessários dois genes defeituosos, sendo um proveniente do pai e outro da mãe do doente. A doença é caracterizada por uma disfunção generalizada das glândulas exócrinas, com caráter evolutivo crônico e progressivo que compromete o funcionamento de praticamente todos os órgãos e sistemas. O sistema respiratório, gastrointestinal e o trato genito urinário são os mais atingidos. As manifestações clínicas incluem doença pulmonar obstrutiva crônica, deficiência nas enzimas pancreáticas, obstruções intestinais e no homem infertilidade. Quando a FC não é tratada pode ser responsável pela morte precoce devido à infecção pulmonar. (REIS; DAMACENO, 1998; RATJEN; DORING, 2003).

A doença foi reconhecida apenas no final dos anos 30, quando o avanço dos antibióticos revelou um grupo de pacientes resistentes à utilização dessas drogas. Os primeiros relatos de taxas elevadas de eletrólitos no suor foram documentados nos anos 50 e a aberração genética apenas no final dos anos 80. Inicialmente, pela sua alta e precoce mortalidade, era considerada uma doença exclusiva do grupo pediátrico (ROSENSTEIN; CUTTING 1998).

Os avanços tecnológico e científico possibilitaram a instalação de diagnóstico precoce e, atualmente, a doença atinge adolescentes e adultos jovens. Entretanto, a expectativa de vida ainda gira em torno de 30 anos de idade. Sua incidência é maior em populações caucasóides, principalmente nos países desenvolvidos, entretanto, ainda não é sabido o motivo de tal incidência. Porém, existem poucos trabalhos analisando a população de portadores de fibrose

cística nos países em desenvolvimento. As medidas de saúde pública nesses países são baseadas em dados internacionais. No Brasil, a falta de informações é evidente (ROSENSTEIN; CUTTING 1998; ALVAREZ *et al.*, 2004).

A FC possui um padrão de herança autossômico recessivo, sendo necessário dois genes defeituosos para manifestação clínica da doença, que deste modo atinge apenas indivíduos homozigotos. Seu diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas encontradas nos pacientes. É confirmado pelo exame do suor, que mede a concentração aumentada do cloro, e também pelo teste de DNA, na tentativa de identificar a mutação da doença (WAGENER; HEADLEY, 2003; GILBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

4.2 Aspectos genéticos e conseqüências das anomalias de transferência iônica nas vias aéreas

O gene da FC localiza-se no braço longo do cromossoma sete, lócus 31, exon 10, é único e é responsável pela codificação de uma proteína do canal de cloro denominada proteína reguladora da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR). Essa proteína encontra-se disposta em dois domínios transmembrana, para a formação do canal de cloro e contém sítios de fosforilação. Portanto, esse canal encontra-se sob a regulação do AMP-cíclico. As alterações encontradas na doença devem-se a mutações no gene da fibrose cística, na proteína CFTR e nos canais de cloro, gerando anormalidades no transporte iônico. Mais de 800 mutações já foram descritas na literatura. Entretanto, a mais freqüente é a deleção de três nucleotídeos específicos (ATT) que determina a falta do aminoácido fenilalanina na posição 508 na proteína CFTR. Essa aberração genética é conhecida como mutação $\Delta F508$ e está presente em aproximadamente 70% dos pacientes na América do Norte e Europa (GRUENERT, 2003; BERNARDINO *et al.*, 2003).

O mecanismo fisiopatológico primário da FC é causado pela anormalidade no transporte do íon cloro nas células epiteliais através da CFTR, que não apresenta o seu canal aberto para a passagem do íon. O canal de cloro encontra-se alterado na borda em escova da célula, evidenciando uma limitação na sua extrusão. Essa alteração é responsável por uma diminuição da permeabilidade ao íon na membrana das células epiteliais. Com a sua menor saída da célula ocorre uma maior reabsorção do íon sódio para a manutenção do equilíbrio cloro/sódio. Essa movimentação do sódio carrega água, diminuindo a hidratação no interior dos canais exócrinos, conseqüentemente, as secreções pulmonares produzidas são viscosas e aderentes (Figura 1). Isso dificulta o *clearance* mucociliar e facilita infecções persistentes (WAGENER; HEADLEY, 2003; GILBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

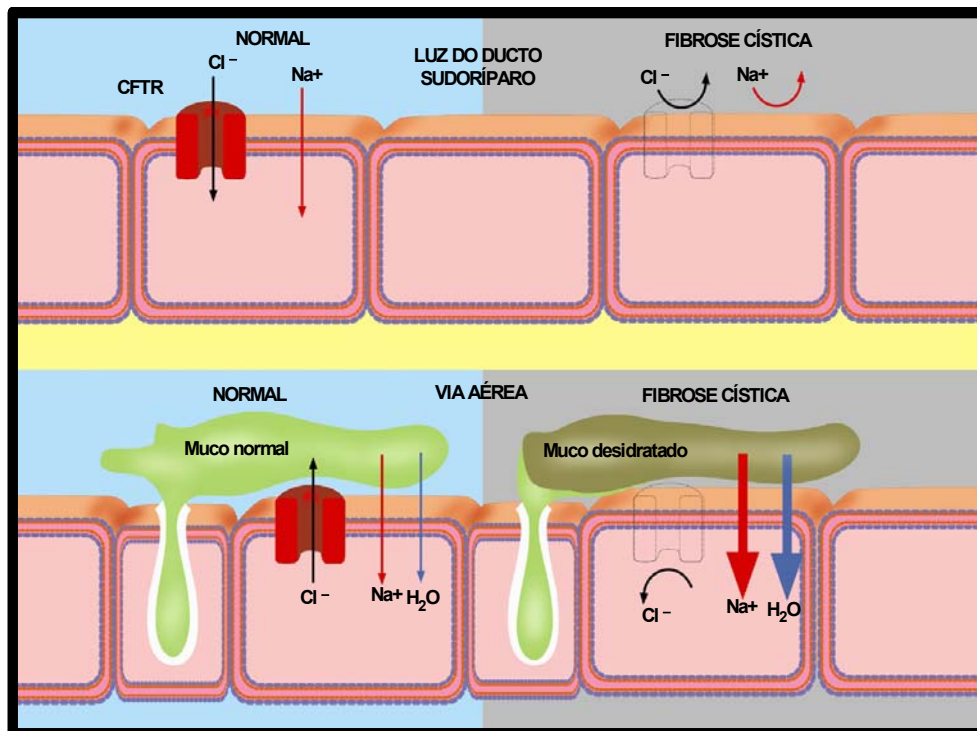


Figura 1: Desenho esquemático das glândulas exócrinas em sujeitos normais e em pacientes portadores de fibrose cística (ROBBINS *et al*, 2000).

Os portadores de FC apresentam eliminação exagerada de sal pelas secreções exócrinas, particularmente pelo suor, onde são encontrados níveis altos dos íons sódio e cloro. Existe uma forte alteração do gene controlador do transporte de cloro, o que bloqueia o

transporte reverso desse íon e sua excessiva excreção pelas glândulas sudoríparas, pâncreas, vias aéreas e pelo intestino. Os sistemas tubulares de condução exócrina, após a excreção de sal, exibem uma exagerada secreção de muco com viscosidade aumentada que obstrui os ductos das glândulas pela difícil remoção. As alterações obstrutivas serão responsáveis por infecções secundárias que conduzem a insuficiência pancreática ou respiratória. As anormalidades no transporte de eletrólitos são responsáveis por alterações nas propriedades físico-químicas do muco, desidratando-o e tornando-o mais espesso e viscoso. Esse muco estagnado na árvore brônquica determina fenômenos obstrutivos, predispondo à infecção e resultando em um círculo vicioso (WAGENER; HEADLEY, 2003; GILBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

Essas infecções são predominantemente causadas por bactérias, embora infecções por vírus e micobactérias também possam ocorrer. Entre os microorganismos mais frequentes encontrados nesses pacientes destacam-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Estas bactérias depois de instaladas são difíceis de serem erradicadas. A colonização dos portadores de fibrose cística contribui para a destruição epitelial progressiva. A versão molecular mais aceita, para justificar a colonização/infecção bacteriana crônica é a de que as alterações iônicas no muco brônquico inibem a função antimicrobiana peptídica, aumentam a secreção de mucinas e reduzem a resistência a patógenos bacterianos (PUCHELLE; BAJOLET; ABELY, 2002).

A disfunção das glândulas exócrinas pulmonares é responsável pela geração de secreções espessas e as alterações anátomo-patológicas que se instalam nos primeiros meses de vida das crianças. Devido à dilatação e hipertrofia das glândulas produtoras de muco, as pequenas vias aéreas são acometidas e ocorre posteriormente obstrução broquiolar, desenvolvimento gradual de bronquiectasias, destruição do parênquima pulmonar e redução

da capacidade funcional respiratória. Existem relatos de que 90% dos pacientes com FC morrem devido à progressão da doença pulmonar (CAMARGOS; QUEIROZ, 2002; ANDRADE *et al.*, 2001).

A obstrução crônica das vias aéreas proporciona o desenvolvimento de processo inflamatório difuso, dilatação e hipertrofia das células secretoras de muco, atelectasias, dispnéia, aprisionamento de ar, alteração na relação ventilação perfusão, diminuição do volume expiratório forçado de primeiro segundo (VEF₁) e capacidade vital, além de hipoxemia, ou seja, oxigenação inadequada. Também, podem ser observadas alterações na absorção de lípidos, refletindo no estado nutricional do paciente e gerando um hipodesenvolvimento global de todo organismo, inclusive do sistema muscular (PINET *et al.*, 2003).

As manifestações clínicas típicas da doença são tosse, diarreia crônicas e desnutrição. Entretanto, a FC também pode se manifestar de outras maneiras, dependendo dos sistemas ou órgãos acometidos. O acometimento respiratório é progressivo, de intensidade variável e ocorre em mais de 95% dos pacientes, sendo que o acometimento pulmonar determina o prognóstico final (REIS; DAMACENO, 1998).

5. APARELHO MUCOCILIAR

5 APARELHO MUCOCILIAR

5.1 Aspectos morfofuncionais

O pulmão humano representa a mais ampla superfície corpórea em contato direto com o ambiente externo. Portanto, possui complexos e numerosos mecanismos físico-químicos e imunológicos específicos e inespecíficos de defesa, uma vez que o sistema respiratório representa um dos alvos principais dos efeitos adversos da poluição atmosférica. Os mecanismos de defesa pulmonar são condicionamento, filtração e limpeza do ar inspirado (HOUTMEYERS *et al.*, 1999; ZIN; ROCCO, 1999; HASANI *et al.*, 2004; MORGAN *et al.*, 2004).

O condicionamento é uma série de eventos fisiológicos que têm por finalidade aquecer, umidificar e depurar substâncias e partículas tóxicas inaladas. Essa função é realizada por alguns segmentos das vias aéreas superiores como, nariz, boca e faringe (SALDIVA, 1990; ZIN; ROCCO, 1999).

O mecanismo de filtração do ar inspirado é assegurado pela ação mecânica dos pêlos do vestíbulo nasal. Nessa fase de defesa pulmonar, ocorre a deposição de partículas na camada mucosa das vias aéreas e quanto maior o volume das partículas maior será sua deposição nas vias aéreas superiores. Esses elementos funcionam como filtro na manutenção da integridade das vias aéreas inferiores. (KING, 2000).

Quando as partículas e os corpos estranhos de menor diâmetro não são retidos no nariz, acabam se depositando nas paredes das vias aéreas inferiores como os brônquios e bronquíolos. Os processos básicos de depuração como a tosse e o sistema mucociliar realizam

essa remoção para manter as vias aéreas relativamente limpas e estéreis (HARDY, 1994; HOUTMEYERS *et al.*, 1999).

O epitélio de revestimento das vias aéreas possui papel importante na homeostase do organismo. A atividade mucociliar, responsável pela remoção de partículas das vias aéreas, representa a mais notável entre as modalidades de proteção e recebe a denominação de transporte mucociliar. Esse transporte consiste no acoplamento entre um componente viscoelástico, o muco brônquico, e o epitélio ciliado que promove um fluxo de fluido em direção à orofaringe. Como consequência ocorre a depuração de substâncias e partículas depositadas ao longo do trato respiratório. Portanto, é um mecanismo de defesa pulmonar frente a microorganismos e agentes agressores inalatórios. Na presença de doenças pulmonares, que alterem esse sistema, essa depuração é realizada através da tosse efetiva. (DONNO *et al.*, 2000).

Na ausência de doenças respiratórias, o sistema mucociliar realiza a higiene brônquica através da interação dos seus componentes. A camada de muco, que protege o epitélio traqueobrônquico, forma uma barreira de defesa contra os agentes nocivos inalados no ar atmosférico (VAN DER SCHANS *et al.*, 1999; LILLEHOJ; KIM, 2002).

5.2 Produção e transporte de muco brônquico humano

Para que a fisiologia do transporte mucociliar seja compreendida é de fundamental importância entender a morfologia do epitélio respiratório, a regulação do fluido ao longo das vias aéreas, a composição bioquímica, reologia dos produtos de secreção brônquica e a mecânica da interação entre o cílio e o muco (SALDIVA, 1990).

Ao longo de sua extensão, o epitélio das vias aéreas vai se modificando de acordo com as diferentes solicitações funcionais de cada microambiente do trato respiratório. Esse epitélio é revestido pelo fluido das células secretoras e pela transudação de líquido dos alvéolos e vias aéreas, o qual é impermeável à água. As células secretoras localizam-se nas glândulas da submucosa dos brônquios e no epitélio das vias aéreas. A secreção dessas células tem como objetivos a absorção e transporte de substância e lise de microorganismos (HOUTMEYERS *et al.*, 1999).

As células ciliadas situam-se sobre o ponto mais alto das células cilíndricas e cilíndrico-cúbicas das vias aéreas e sua altura diminui progressivamente das vias aéreas proximais para as distais. Possuem forma colunar e um cílio típico consiste de nove duplas de microtúbulos periféricos de fibrilas tubulares, interligados por pontes de proteínas, dispostos ao redor de um par central. O total de cílios gira em torno de 3×10^{12} . Os diferentes fenótipos das células ciliadas ao longo do trato respiratório visam a propiciar uma adequação da velocidade de transporte às necessidades de cada segmento do trato respiratório. A motilidade ciliar é obtida através da energia fornecida pela hidrólise do ATP, pela dineína ATPase. Seu movimento é do tipo pendular, todos os cílios se alinham paralelamente, cada fila bate de maneira sincrônica antes da subsequente e logo após a precedente. Além da ação da ATPase, outros fatores como a concentração de íon cálcio interferem na motilidade ciliar, através da modificação dos níveis de atuação da dineína ATPase (IBANEZ-TALLON; HEINTZ; OMRAN, 2003; HO *et al.*, 2001).

O fluido brônquico é composto por duas fases: a epífase gel e a hipófise sol. A primeira fragmenta-se em diversos pontos pela ação do batimento ciliar e é formada pelo produto de secreções das células mucosas do epitélio e glândulas submucosas. A segunda é contínua desde a traquéia até os bronquíolos e é produzida pela secreção de células serosas,

pelas células de Clara, pelo fluxo de água dos vasos sanguíneos e linfáticos, associados ao transporte ativo de líquido pelo epitélio (KING, 1998).

No momento de sua formação, o muco tem consistência fluida, após a sua excreção no lúmen das vias aéreas, o movimento ciliar providencia a sua distribuição entre os cílios (fluido intersticial) e sobre eles (tapete mucoso). Em condições normais, apenas o fluido interciliar está presente nas vias aéreas. O muco é composto por aproximadamente 1% do seu peso de sais e outros componentes, 0,5 - 1% de proteínas livres, uma proporção similar de carboidratos ricos em glicoproteínas e mais de 95% de água. No muco bronquial, é adicionada uma quantidade significativa de lipídios (HOUTMEYERS *et al.*, 1999).

Um aumento na espessura da hipófise sol seria responsável pelo desacoplamento entre o muco e o cílio, já a sua diminuição acarretaria prejuízo no transporte ciliar. A regulação da quantidade de fluido nessa fase depende das células epiteliais. Essas células absorvem e secretam líquidos utilizando energia para que, através de diferenças de concentração e diferenças de carga elétrica na membrana, as movimentações iônicas possam ocorrer (IBAÑEZ-TALLON; HEINTZ; OMRAN, 2003).

O transporte de íons através do epitélio produz diferenças de concentração e a água se movimenta da solução menos concentrada para a mais concentrada através do espaço intercelular, portanto o estado funcional dos canais de sódio, que são responsáveis pela absorção de água da face interna para o interstício e dos canais de cloro, que são responsáveis pela secreção de água para a face interna, desempenha um papel fundamental para um perfeito acoplamento entre o muco e o cílio. A propulsão do fluido brônquico pelos cílios é conseguida pelo fato do batimento ciliar ser assimétrico. O ciclo do batimento ciliar é dividido em duas fases, uma de batimento efetivo, onde o cílio alcança sua extensão máxima e penetra na sua

extremidade, na epífase gel em um plano perpendicular à superfície da célula ciliada. A segunda fase do batimento ciliar recebe a denominação de batimento de recuperação, no qual o cílio se dobra e retorna à posição inicial, com uma velocidade duas vezes menor que a do batimento efetivo (IBAÑEZ-TALLON; HEINTZ; OMRAN, 2003).

5.3 Propriedades reológicas do muco brônquico

Estudos físico-químicos do muco brônquico têm mostrado que diferentes tipos de proteínas e glicoproteínas são os seus principais constituintes e formam um esqueleto protéico único, ao qual se acoplam múltiplas cadeias de açúcares. A composição de aminoácidos dessas glicoproteínas é bastante incomum e possui duas porções: uma glicosilada (possui glicose) em que seus componentes se ligam por meio de ligações denominadas O-glicosídicas e outra não glicosilada, rica em cisteína, que é capaz de interagir através de ligações de pontes dissulfeto intra e intermoleculares (KING, 1998).

O grande número de possibilidades de ligações existentes tanto na porção glicosilada como não glicosilada faz prever que as glicoproteínas do muco possam assumir uma configuração bastante peculiar na luz das vias aéreas. Sua estrutura macromolecular é determinada pelas ligações de dissulfeto intra e intermoleculares, bem como pelas ligações O-glicosídicas entre os açúcares que compõe as glicoproteínas. Outros fatores como o grau de hidratação do muco e teor de outras macromoléculas (imunoglobulinas e DNA), o pH e a composição iônica do meio interferem com o arranjo espacial das moléculas de glicoproteínas, alterando conseqüentemente o seu comportamento mecânico (KING, 1998).

A presença de ligações estáveis como as pontes dissulfeto e as ligações O-glicosídicas, ao lado de interações iônicas de menor estabilidade, preenche os requisitos moleculares para a existência de um componente elástico (ligações estáveis) e de outro componente deformável, viscoso, representado, pelas ligações menos estáveis. Devido a essa complexa conformação

bioquímica de natureza polimérica, o muco brônquico tem um número de propriedades não-lineares e dependência temporal de fluxo, sendo considerado um material viscoelástico. Portanto, tem características líquidas e sólidas. A viscosidade é a resistência ao fluxo e representa a capacidade de um material absorver energia enquanto se move. A elasticidade é a capacidade de um material armazenar energia, para se mover ou deformar-se. A espinabilidade corresponde à capacidade específica do muco ser esticado, alongado. Em líquidos viscoelásticos como o muco, a viscosidade diminui com o aumento da tensão e as mudanças entre a viscosidade e a elasticidade estão geralmente interligadas (KING, 1998).

Como o muco apresenta um comportamento viscoelástico, parte da energia transmitida pelo cílio ao muco é dissipada sob forma de calor. O parâmetro, que regula a eficiência da transmissão de energia do cílio no tapete mucoso, representa a relação entre energia dissipada e energia armazenada por batimento. Quanto maior esta relação mais energia ciliar será perdida na forma de calor com conseqüente perda de eficiência mecânica do sistema (HOUTMEYERS *et al.*, 1999).

5.4 Regulação da depuração mucociliar na saúde e na doença

O transporte do muco brônquico depende da integridade do componente ciliar do sistema mucociliar e da capacidade do muco ser transportável pelos cílios e pela tosse, assim como depende das propriedades físicas do mesmo. Em sujeitos saudáveis, o muco brônquico e a atividade mucociliar representam uma eficiente barreira contra partículas exógenas e bactérias. O muco engloba as bactérias e os agentes nocivos, e o transporte dos mesmos para fora das vias aéreas é realizado pelo batimento dos cílios. Em condições patológicas, o aumento no volume de muco, assim como mudanças em suas propriedades fisicoquímicas, debilitam a atividade ciliar, resultando em uma deficiência do transporte mucociliar, que pode ser compensada pelo mecanismo de tosse (HARDY, 1994).

Fatores fisiológicos tais como idade, sexo, postura e exercícios podem influenciar a depuração mucociliar devido às alterações nos cílios, no muco, no líquido periciliar e ou na combinação de ambos. Várias doenças também podem estar relacionadas com alterações no transporte mucociliar. Nos pacientes portadores de FC, ocorre alteração importante no componente viscoelástico do muco devido às anormalidades no transporte iônico. Como resultado, a eficácia do mecanismo de *clearance* mucociliar fica prejudicada e os pulmões podem ficar mais susceptíveis às infecções bacterianas (HOUTMEYERS *et al.*, 1999).

5.5 Métodos de avaliação da transportabilidade do muco brônquico e estudos de suas propriedades reológicas

O transporte do muco brônquico depende da integridade do componente ciliar do sistema mucociliar, da capacidade do muco ser transportável pelos cílios e pela tosse e de suas propriedades físicas. Existem diferentes métodos de coleta desse material. Porém, a maioria dos estudos recorre ao escarro, que é a secreção eliminada das vias aéreas através da boca. A expectoração é uma forma de coleta não invasiva, porém, o muco expectorado pode ser contaminado por componentes de escamação epitelial e saliva. Após a coleta a técnica de congelamento e de armazenamento é de fundamental importância para evitar danos celulares (PUCHELLE; ZAHM, 1988; VAN DER SCHANS *et al.*, 1999; KING, 2000; OUT; JANSEN; LUTTER, 2001).

Um sistema utilizado para o estudo do transporte mucociliar é realizado no palato de rã. Esse sistema é viabilizado por um modelo experimental utilizado nos laboratórios que estudam as propriedades reológicas do muco respiratório, uma vez que o palato de rã possui um epitélio similar ao das vias aéreas dos mamíferos (MACCHIONE *et al.*, 1995).

Para o estudo do deslocamento do muco também são utilizados modelos de máquina simuladora de tosse que avaliam a eficiência das forças envolvidas na interação ar-muco durante a tosse, o local das vias aéreas de mais fácil movimentação do muco e a ampliação desse fenômeno. O transporte do muco através da tosse é um mecanismo complexo que depende de fatores, como o padrão do fluxo aéreo, o diâmetro, o comprimento e a flexibilidade do tubo utilizado como modelo de via aérea, a presença da fase sol, a espessura e as propriedades físico-químicas da fase gel do muco (KING, 2000).

A força de adesão entre o muco e uma superfície sólida e a medida do seu ângulo de contato são reflexos da tensão superficial desse material. A propriedade física que demonstra o comportamento de um líquido sobre uma superfície plana é denominada *wettability*, sendo caracterizada pelo ângulo de contato (também denominado ângulo de adesão); expressa a capacidade do material, no caso o muco, se espalhar quando colocado sobre uma superfície plana. Algumas técnicas podem ser utilizadas para a leitura desse ângulo através da visualização de uma gota do material sobre uma lâmina pelo goniômetro. O sistema é inclinado e o ângulo é medido quando a gota está em movimento (MACCHIONE *et al.*, 1995; HOUTMEYERS *et al.*, 1999).

O microrreômetro magnético é usado para o estudo de propriedades viscoelásticas do muco normal do trato respiratório principalmente com amostras que são moderadamente claras e com uma viscoelasticidade intermediária. No entanto, com certa adaptação, ele pode ser utilizado para análise de escarro com ampla variabilidade de propriedades reológicas e grande opacidade. Esta técnica permite a mensuração da viscoelasticidade dinâmica com a utilização de microlitros de muco. É realizada a partir do estudo da relação temporal entre a

força e deslocamento de uma pequena bola de aço submetida à ação de um campo magnético (KING, 1998).

6. AEROSOLTERAPIA

6 AEROSSOLTERAPIA

A utilização de medicação inalatória sob a forma de aerossol para o tratamento de doenças do trato respiratório tem uma longa história na terapia medicamentosa. Apesar de o termo “aerossol” não ter sido utilizado antes de 1920, a terapia inalatória com propósitos terapêuticos data de 4.000 anos atrás, na Índia. No final do século XVIII e durante século XIX, as nebulizações tornaram-se populares. Os primeiros nebulizadores foram desenvolvidos na França, nos anos de 1800, e foram definidos como instrumentos para converter uma solução em partículas de aerossol, especialmente, para propósitos médicos. Nos últimos 50 anos, houve um grande avanço na aerossolterapia, devido aos progressos tecnológicos e científicos. (ANDERSON, 2005; RAU, 2005).

Um nebulizador pode ser utilizado para inalação quando um sistema mais simples não pode produzir um efeito otimizado. Converte uma solução em partículas de aerossol que estão suspensas em uma corrente de gás. O objetivo de uma terapia por nebulização é distribuir uma dose terapêutica de substâncias prescritas como aerossol na forma de partículas respiráveis, ou seja, menores que 5 μm de diâmetro. O tempo da terapia pode variar entre 10 a 15 minutos (CATALDO *et al.*, 2001; HAIDL *et al.*, 2000).

Para a realização da nebulização, existem dois tipos de aparelhos disponíveis. Os nebulizadores a jato e os ultra-sônicos. No nebulizador a jato, o gás dirigido é forçado através de um orifício estreito. A pressão negativa, criada em volta do orifício, atrai para cima a solução e o jato de gás fragmenta o líquido em gotículas. As menores partículas na forma de névoa são disponibilizadas para o paciente, e as maiores caem novamente para dentro do reservatório, para serem recicladas (DOLOVICH, *et al.*, 2005).

No nebulizador ultra-sônico, o aerossol é criado a partir de ondas sonoras de alta frequência (1-2 MHz). Uma corrente elétrica aplicada a um cristal piezelétrico causa as vibrações ultra-sônicas. As ondas sonoras propagam-se através líquido até a superfície onde produzem o aerossol. O tamanho da partícula é influenciado pela frequência de oscilação do cristal (DOLOVICH, *et al.*, 2005).

7. PATÓGENOS NA FIBROSE CÍSTICA

7 PATÓGENOS NA FIBROSE CÍSTICA

Os pacientes com FC sofrem infecções repetidas e, em cada exacerbação, a função pulmonar piora. Eventualmente, estes pacientes podem evoluir com falência pulmonar e morte. Existem várias hipóteses que relacionam a mutação na CFTR com as infecções recorrentes. Entretanto, não há consenso entre elas (RATJEN; DORING, 2003).

Pouco se sabe em relação às alterações no gene da CFTR e sobre a maior predisposição dos pacientes portadores de FC a uma bactéria específica dentre as mais freqüentemente encontradas. Entretanto, a colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa* está associada com o aumento significativo da morbidade dos pacientes e sua associação com *Staphylococcus aureus* relacionada ao aumento significativo da mortalidade (PLOTKOWSKI; BAJOLET-LAUDINAT; PUCHELLE, 1993).

As células epiteliais dos portadores de FC diferem das células de sujeitos normais na permeabilidade aos íons cloro e na liberação de glicoconjugados de alto peso molecular. Esses fatores podem estar relacionados à interação das bactérias com a superfície das vias aéreas. A bacteriologia do trato respiratório, realizada através da cultura de escarro, prediz, com precisão, a presença e o tipo de bactéria nos pulmões (RATJEN; DORING, 2003).

A infecção pulmonar crônica é, usualmente, associada com um número limitado de organismos. *Staphylococcus aureus* é, geralmente, a primeira bactéria encontrada na cultura de secreção pulmonar desses pacientes, portanto é isolada principalmente em lactentes. A causa da sua presença precoce e persistente é desconhecida, mas uma importante propriedade dessa bactéria é sua habilidade para mudanças fenotípicas. Sua virulência depende de dois fatores que estão relacionados à capacidade da bactéria aderir ao epitélio respiratório e evadir o

clearance imune. O ácido teicóico, um polímero de ribitol, um açúcar alcóolico formado pela redução da ribose, e glicerofosfatos, e o muco parecem estar envolvidos na aderência desse microrganismo às células da mucosa do epitélio respiratório. Entretanto, a maneira como esses fatores interagem nesse processo ainda não é conhecida. (GILLIGAN, 1991; BENTZMANN; ROGER; PUCHELLE, 1996; SADOWSKA *et al.*, 2002).

Essa bactéria produz uma variedade de fatores de virulência que permitem a alteração do *clearance* imune, entre os quais podem ser citados: a leucocidina, que é particularmente eficaz em causar danos às células fagocitárias, e a proteína A, que se liga a imunoglobulina G, impedindo sua função como anticorpo. Também são produzidos outros fatores responsáveis pela virulência como as hemolisinas, hialuronidase, catalase, coagulase e uma variedade de exotoxinas. A lesão da via aérea por *Staphylococcus aureus* ocorre através da liberação de toxinas extracelulares ou do estímulo à resposta inflamatória, facilitando a ligação e aderência posterior de *Pseudomonas aeruginosa* (GILLIGAN, 1991).

A predisposição dos portadores de FC para a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* é conhecida, entretanto, ainda não existe explicação satisfatória para o fenômeno. Essa bactéria é a que possui o maior índice de colonização nesses pacientes, com taxas que variam de 50 a 70% e aumentam com a idade. Entretanto, não coloniza, com frequência, os pacientes nos primeiros anos de vida. Está mais presente na infância tardia e adolescência, sendo 70 a 90% dos pacientes, eventualmente, infectados. O curso da infecção crônica varia muito e não se conhece completamente o motivo pelo qual esse fenômeno acontece (REIS; DAMACENO, 1998).

As cepas de *pseudomonas aeruginosa* associadas à fibrose cística produzem uma cápsula de exopolissacáride mucoide, derivado do ácido poliurônico, que contém um

composto conhecido como alginato que confere às colônias um fenótipo mucoide típico bioquimicamente diferente do produzido por *Staphylococcus aureus* (GILLIGAN, 1991).

Essa bactéria produz uma quantidade numerosa e uma grande variedade de fatores de virulência, que incluem a exotoxina A, exoenzima S, elastase, protease alcalina, flagelo, dois tipos de hemolisinas, *pili* (semelhantes a flagelos, porém mais curtos e numerosos) e exopolissacáride mucoide. Também produz, freqüentemente, um lipopolissacáride rugoso de baixa toxigenicidade o que pode explicar uma densidade tão alta no interior da árvore traqueobrônquica, sem causar toxemia no paciente infectado. A aderência de *Pseudomonas aeruginosa* ao epitélio dos pacientes portadores de FC pode ser atribuída ao grande número de receptores asialilados, que servem como receptores da bactéria na superfície das células (MARKS, 1990; GILLIGAN, 1991; BENTZMANN; ROGER; PUCHELLE, 1996).

Também existem relatos de que as proteases da pseudomonas causam a liberação de mucinas do epitélio respiratório. As mucinas nos portadores de FC são mais sulfonadas e quando se combinam com o exopolissacáride mucoide, na presença do íon cálcio, formam um gel mais viscoso. O aumento desse gel é responsável pela maior formação de micro-colônias que podem ser responsáveis pela piora do *clearance* ciliar (KLINGER; TANDLER; LIEDKT; BOAT, 1984).

Algumas evidências demonstram que, nos portadores de FC infectados por *Pseudomonas aeruginosa*, os anticorpos estão defeituosos, pois o exopolissacáride mucóide pode proteger o microorganismo do sistema imune, inibindo a imunoglobulina G. Esses pacientes possuem altos níveis de complexos imunes circulantes e possuem uma pobre função pulmonar. Além disso, os fluidos brônquicos possuem aumento das reações inflamatórias e altas atividades de elastase (GILLIGAN, 1991).

Portanto, a presença das bactérias no epitélio respiratório de portadores de FC é responsável pela liberação de citocinas e mediadores inflamatórios responsáveis pela ativação de neutrófilos polimorfonucleares que não são efetivos na fagocitose, e liberam proteases e radicais livres. A elastase neutrofilica é capaz de destruir as macromoléculas da matriz do tecido conjuntivo pulmonar e as células epiteliais, reduzindo os batimentos ciliares, alterando a secreção de proteínas do muco, fragmentando imunoglobulinas. Tudo isso gera uma fagocitose efetiva com morte de leucócitos e liberação de quantidades exageradas de DNA e filamentos de actina, que pioram a viscoelasticidade e adesividade do muco (REIS; DAMACENO, 1998).

8 FOTOACÚSTICA

Apesar de o efeito fotoacústico ter sido descoberto, em 1880, por Alexander Graham Bell, apenas a partir da década de 1970, quando Rosencwaig e Gersho publicaram o modelo matemático para a difusão térmica em amostras sólidas, a técnica fotoacústica teve seu uso difundido na caracterização de materiais (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976). Hoje, constitui uma opção experimental que tem sido utilizada na caracterização óptica e térmica de diversos materiais, como líquidos, gases e particularmente materiais biológicos (ROSENCWAIG, 1982; ANJOS, *et al.*, 2005; ROSSI; BARJA, 2006).

O modelo matemático proposto por Rosencwaig e Gersho, também chamado de “modelo RG” ou modelo “do pistão acústico”, baseia-se na absorção de luz modulada (ou pulsada) e mostra como a amplitude e a fase do sinal fotoacústico dependem, por exemplo, de propriedades como coeficiente de absorção óptica, difusividade e efusividade térmicas (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976). No caso da incidência direta de luz na amostra, o sinal depende de como a luz é absorvida pela amostra (coeficiente de absorção) e das condições de geração e transmissão de calor do sistema (ROSENCWAIG, 1982; BARJA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2005).

Quando um feixe de luz modulada (pulsada) atinge a amostra, a radiação absorvida pode ser transformada em energia térmica por desexcitação não-radiativa. Esse processo pode originar os efeitos de difusão térmica, expansão térmica e flexão termoelástica (LOBATO; BARJA; RODRIGUES, 2006). Em alguns casos, pode-se observar também um componente relacionado à evolução de gases (BARJA *et al.*, 2003).

Para as amostras analisadas no presente estudo (material viscoso), pode-se assumir que o sinal fotoacústico é basicamente gerado pelo mecanismo de difusão térmica. De acordo com o modelo de Rosencwaig-Gersho, a flutuação de temperatura na amostra pode ser propagada até a camada de ar adjacente ao material absorvedor, gerando ciclos de expansão e compressão nessa camada de ar. Essas ondas de pressão podem ser detectadas por um microfone posicionado no interior da célula fotoacústica (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976).

O modelamento matemático do sinal é gerado pela solução da equação de difusão térmica para o sistema, tendo, como condições de contorno, a continuidade do fluxo de calor e a igualdade de temperatura nas interfaces (ROSENCWAIG, 1982; BARJA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2005).

A equação de difusão térmica unidimensional é dada por:

$$\frac{1}{\alpha} \frac{\partial T(x,t)}{\partial t} = \frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2} + \frac{s(x,t)}{k} \quad (\text{Equação 1})$$

onde α é a difusividade térmica em $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$, k é a condutividade térmica em $\text{W}.\text{cm}^2.\text{K}^{-1}$, T é a temperatura, t o tempo e x a distância de propagação.

A efusividade térmica (ε) é considerada uma importante propriedade termofísica em estudos que envolvem processos de aquecimento e resfriamento de uma amostra. Mede essencialmente a impedância da amostra, ou seja, a sua habilidade de trocar calor com o ambiente (BALDERAS-LÓPEZ *et al.*, 1995), sendo definida pela equação:

$$\varepsilon = \sqrt{k\rho c} \quad (\text{Equação 2})$$

onde k , ρ e c são, respectivamente, condutividade térmica, densidade e calor específico.

Em algumas situações, o calor modulado, produzido no interior da amostra, precisa atingir a superfície para que sejam produzidas as ondas acústicas. Como a amplitude do sinal diminui exponencialmente com a distância, só a parcela de radiação, absorvida a uma distância de até um comprimento de difusão térmica (μ) da superfície, será responsável pelo sinal fotoacústico (ROSENCWAIG, 1982). O comprimento de difusão térmica para um determinado material é dado por:

$$\mu = \sqrt{\frac{\alpha}{\pi f}} \quad (\text{Equação 3})$$

onde f é a frequência de modulação da luz e α é a difusividade térmica, definida por:

$$\alpha = \frac{k}{\rho c} \quad (\text{Equação 4})$$

onde k é a condutividade térmica da amostra, ρ é a densidade e c é o calor específico da amostra ou do ar.

Um material pode ser classificado em termos do seu comprimento de difusão térmica para uma dada frequência de modulação. Se a espessura do material é menor que μ , ele é considerado termicamente fino; por outro lado, quando a espessura do material é maior que μ , ele é dito termicamente espesso.

O sinal fotoacústico pode refletir mudanças ocorridas na amostra sob análise, permitindo monitorar processos como desidratação e/ou solubilização através da alteração que tais processos produzem nas propriedades térmicas da amostra, modificando o sinal fotoacústico durante o processo (ROSSI; BARJA, 2006).

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Cuidados Éticos

Neste estudo, tratou-se de uma análise prospectiva da comparação do tempo de solubilização do muco em portadores de FC, colonizados por diferentes bactérias. A identidade dos sujeitos envolvidos não foi revelada e os procedimentos realizados já foram desenvolvidos na prática clínica e não ofereceram grandes riscos aos sujeitos envolvidos.

O trabalho iniciou-se após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), protocolo número L137/2005/Cep, e após consentimento por escrito do paciente ou responsável.

9.2 Métodos de Avaliação

9.2.1 Coleta do muco brônquico

Todas as amostras de muco foram coletadas após a sessão de fisioterapia respiratória, para facilitar a expectoração. O voluntário foi instruído a tossir, e se necessário, contou com o auxílio do fisioterapeuta. A expectoração foi realizada sobre um coletor universal de escarro e as amostras de muco foram imediatamente separadas da saliva, visto que o excesso de saliva poderia contaminar o muco brônquico e alterar suas propriedades reológicas e, conseqüentemente, a sua solubilização (FAHY *et al*, 1995; OUT; JANSEN; LUTTER, 2001).

Após o procedimento de coleta, o muco foi armazenado em *eppendorf's* numerados para que as amostras pudessem ser identificadas. Os *eppendorf's* foram previamente preenchidos com óleo de vaselina (Rioquímica[®] - Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA.) para que não ocorresse desidratação desse muco. As amostras foram estocadas a uma

temperatura de -70°C , com período máximo de duas horas entre a coleta e o congelamento. O material permaneceu congelado por um período máximo de 10 dias, para evitar alterações na reologia do muco que pudessem interferir na sua solubilização (KING, 2000).

9.2.2 Fotoacústica

O esquema experimental deste trabalho utilizou a célula fotoacústica de duas fases com configuração de incidência dianteira (Figuras 2 e 3). Nela, uma das faces foi fechada com uma janela de vidro e a outra com uma folha de alumínio (material opaco) de $25\ \mu\text{m}$ de espessura, que foi utilizada tanto como suporte para a amostra quanto para absorver a luz incidente proveniente da fonte de luz modulada. A amostra de muco foi posicionada acima da câmara fotoacústica e o feixe de luz atravessou primeiro a camada de gás dentro da câmara até alcançar o alumínio. Nessa câmara foi gerada a onda acústica, a qual foi transmitida por um canal de ar até o microfone.

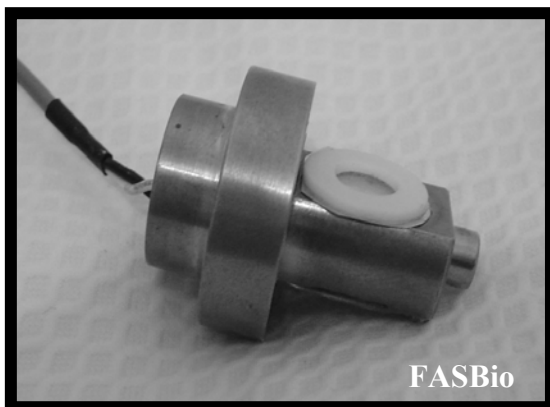


Figura 2: Célula fotoacústica de duas faces.

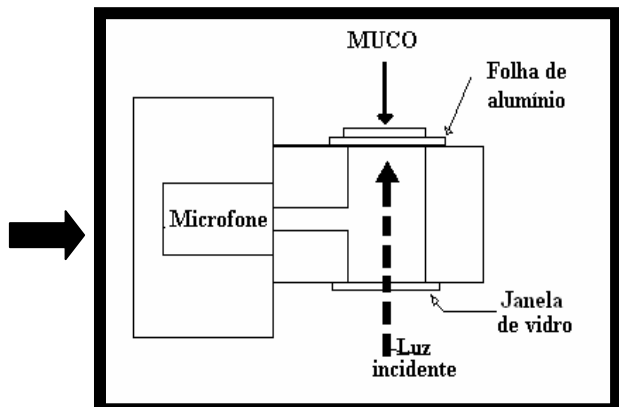


Figura 3: Desenho esquemático do corte transversal da célula de duas faces.

A detecção do sinal fotoacústico utilizou como fonte de luz uma lâmpada halógena de tungstênio (Xelux, 24V - 250W) que foi modulada mecanicamente com um modulador mecânico ou *chopper* (SRS, mod. SR540 - USA). A frequência de modulação foi de 23 Hz.

Lentes e espelhos foram utilizados para levar a luz até a câmara fotoacústica, que é hermeticamente fechada na atmosfera ambiente, de forma que contém ar em seu interior, na mesma pressão do ambiente do laboratório. Um microfone de eletreto detectou o som gerado na câmara. O modulador mecânico e a saída do microfone foram conectados a um amplificador síncrono (*lock-in*) (SRS, mod. SR530 - USA), para que as medidas da amplitude e da fase do sinal fotoacústico fossem captadas. O amplificador *lock-in* estava em comunicação com um computador para que os dados fossem armazenados. O arranjo experimental utilizado está ilustrado na Figura 4.

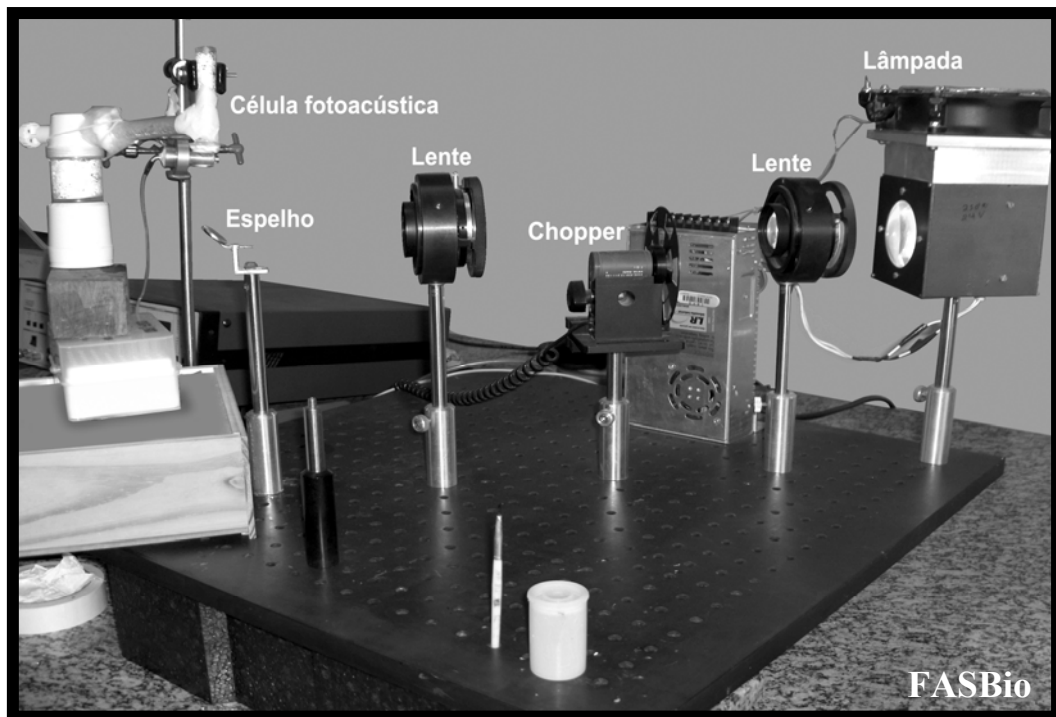


Figura 4: Arranjo experimental utilizando a célula fotoacústica com duas faces.

9.3 Amostra

Para este estudo foram selecionados pacientes com diagnóstico de FC que deveria ser confirmado pelo teste de suor. Os pacientes deveriam ser capazes de expectorar após a sessão de fisioterapia respiratória, e de acordo com a presença ou não de colonização e o tipo de

bactéria presente nas amostras, confirmado através da bacteriologia pela cultura de escarro dos voluntários, foram divididos em três grupos:

Grupo I: Pacientes com fibrose cística, sem colonização.

Grupo II: Pacientes com fibrose cística, colonizados por *Staphylococcus aureus*.

Grupo III: Pacientes com fibrose cística, colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*.

Os pacientes, que não se enquadrem nos critérios propostos, foram excluídos do estudo.

Foram analisadas vinte e seis amostras de muco no total, sendo sete amostras do grupo de pacientes sem colonização (grupo I), nove do grupo colonizado por *Staphylococcus aureus* (grupo II) e dez do grupo colonizado *Pseudomonas aeruginosa* (grupo III).

9.4 Situação Experimental

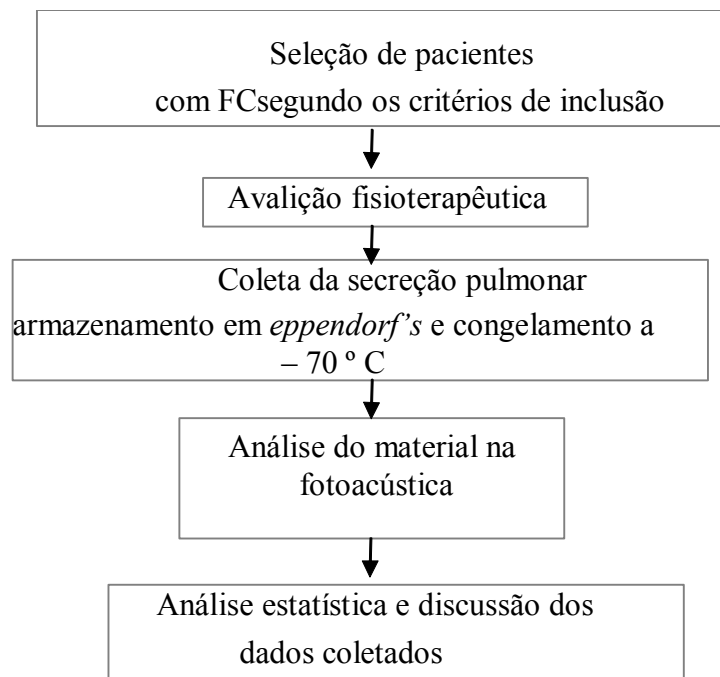
As análises experimentais foram realizadas no Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

As amostras de muco foram descongeladas e, em seguida, foram submersas rapidamente, em éter de petróleo, segundo o protocolo descrito por Lorenzi *et al.* (1992), para que o óleo de vaselina fosse retirado da amostra e não interferisse nas propriedades reológicas do material e conseqüentemente na análise posterior da solubilização. Em seguida a amostra foi colocada sobre a folha de alumínio na célula fotoacústica.

O volume da amostra foi de 0,1mL em cada medida, e o sinal fotoacústico foi monitorado através do programa SISCOMF, ajustado para registrar 50 pontos com uma frequência de 23Hz. As medidas foram realizadas a cada 5 minutos, com um tempo total de

uma hora e quinze minutos. Nos primeiros 15 minutos, a amostra foi nebulizada com solução salina isotônica através de nebulizador ultra-sônico, com frequência de 1,6MHz.

9.5 Fluxograma Experimental



9.6 Parâmetros de ajuste e análise estatística

O presente estudo teve por finalidade analisar os parâmetros referentes ao tempo do processo de solubilização do muco brônquico em portadores de FC, em solução salina isotônica. A evolução do processo de solubilização em função do tempo pode depender de vários fatores, tais como o processo empregado para a solubilização e o tipo de agente que é utilizado nesse processo. Para descrever o processo de solubilização das amostras de cada um dos grupos experimentais, foram avaliados os seguintes parâmetros: i) sinal fotoacústico relativo pós-solubilização (S_R) que indica o aumento do sinal fotoacústico durante o processo

monitorado, sendo igual a 1, quando não se observa alteração no sinal; ii) tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0); e iii) intervalo de tempo de solubilização (dt).

Os parâmetros t_0 e dt foram obtidos através do ajuste das curvas experimentais, realizado com o auxílio do programa Origin® 7.0, utilizando-se a equação de *Boltzmann* (equação 4), que produz uma curva sigmoidal:

$$PA(t) = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{1 + e^{(t-t_0)/dt}} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde PA é a amplitude do sinal fotoacústico em função do tempo; A_1 é a amplitude inicial; A_2 , a amplitude final do sinal fotoacústico; t_0 é o tempo de pico da velocidade de solubilização; e dt o intervalo de tempo de solubilização. A Figura 5 mostra o modelo da curva de ajuste empregada.

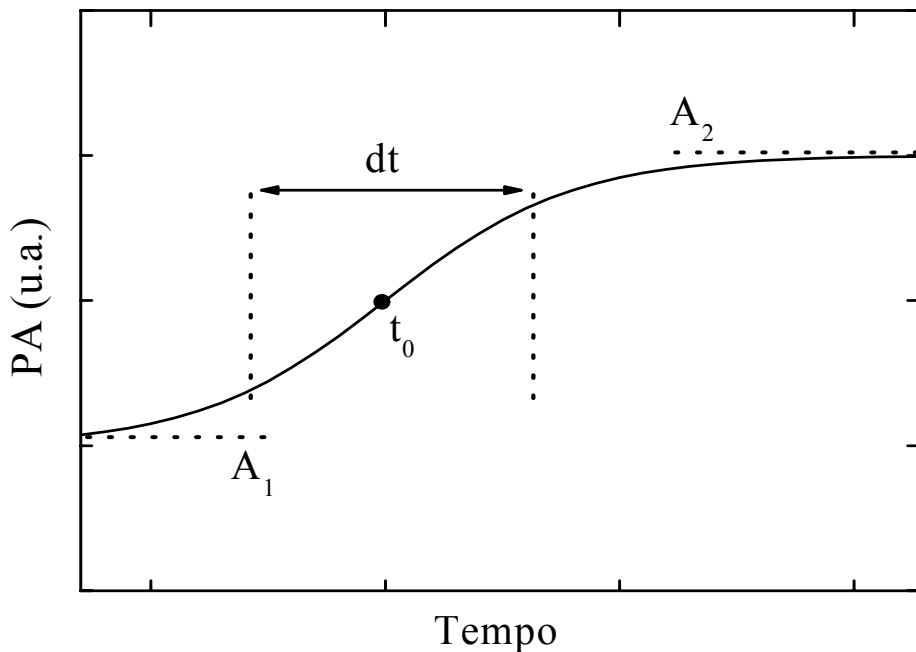


Figura 5: Modelo de curva sigmoidal com os parâmetros de ajuste.

O sinal fotoacústico relativo pós-solubilização (S_R) foi calculado a partir da relação:

$$S_R = \frac{A_2}{A_1} \quad (\text{Equação 6})$$

Para realização da análise estatística das variáveis de interesse, foi utilizado o programa InStat® (GraphPad, Inc.).

Para avaliar o aumento do sinal fotoacústico durante o processo de solubilização, foi efetuada a análise estatística do sinal fotoacústico relativo pós-solubilização (S_R) de cada grupo, sendo investigado se o valor de S_R era ou não significativamente maior do que 1, indicando ganho efetivo de solubilização. Como a variável S_R apresentava distribuição normal (de acordo com o teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*), utilizou-se um teste paramétrico, o teste *t-Student* pareado.

Como o tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0) e o intervalo de tempo de solubilização (dt) entre os grupos não apresentaram distribuição normal (de acordo com o teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*), para essas variáveis a análise comparativa entre grupos foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

O nível de significância considerado foi de 95% ($p < 0,05$).

10. RESULTADOS

10 RESULTADOS

A análise descritiva do sinal relativo pós-solubilização (S_R), do tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0) e do intervalo de tempo de solubilização (dt) dos grupos está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Sinal relativo pós-solubilização (S_R), tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0) e intervalo de tempo de solubilização (dt) dos grupos.

Parâmetros	grupo I (n = 7)	grupo II (n = 9)	grupo III (n = 10)
S_R	$1,12 \pm 0,06$	$1,07 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,02$
t_0 (min.)	10 ± 2	23 ± 4	$9,4 \pm 0,8$
dt (min.)	4 ± 2	$2,5 \pm 0,9$	$0,2 \pm 0,1$

Nota: grupo I: sem colonização; grupo II: colonizados por *Staphylococcus aureus*; grupo III: colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*. Resultados expressos na forma (média \pm erro padrão).

A seguir, a figura 6 mostra as curvas médias de ajuste para as medidas fotoacústicas em de cada um dos grupos estudados.

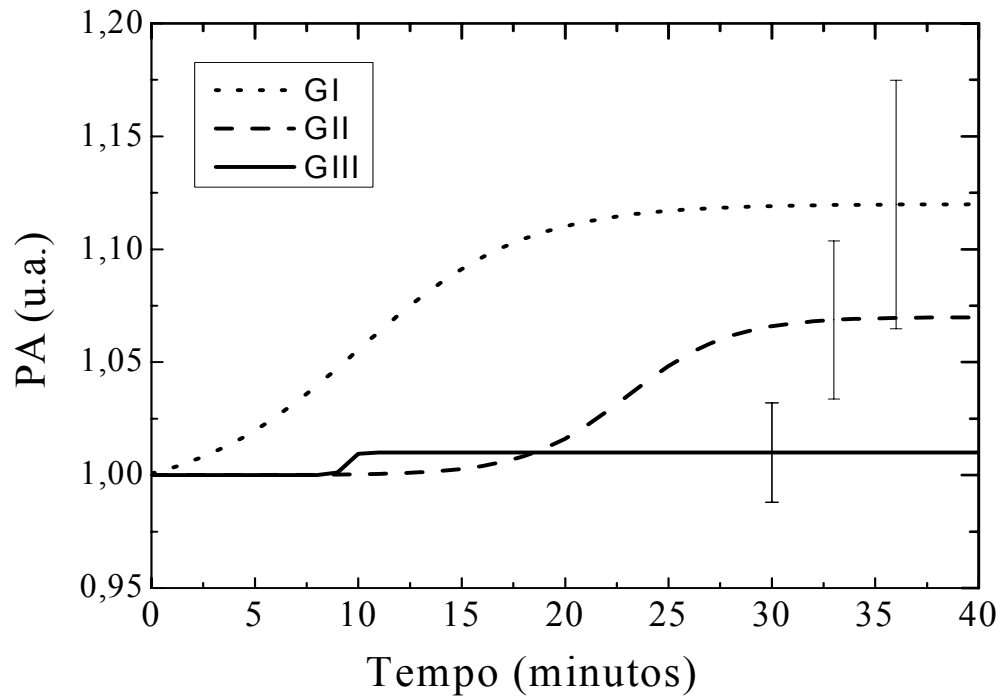


Figura 6: Curvas médias de ajuste para as medidas fotoacústicas nos grupos I (sem colonização), II (colonizados por *Staphylococcus aureus*) e III (colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*).

Os resultados do teste *t-Student* pareado para análise de S_R são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valor de p para teste *t-Student* pareado do valor de S_R ($H_0: S_R=1$; $H_1: S_R>1$).

Grupos	p
I	< 0,05
II	< 0,10
III	ns

Nota: grupo I: sem colonização; grupo II: colonizados por *Staphylococcus aureus*; grupo III: colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*. ns: não significativo

Quanto ao intervalo de tempo de solubilização (dt) e ao tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0), os resultados da análise estatística comparativa são apresentados respectivamente nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Intervalo de tempo de solubilização (dt) dos grupos.

Comparação	dt (min.)	p
I x II	4 ± 2 x $2,5 \pm 0,8$	ns
I x III	4 ± 2 x $0,2 \pm 0,1$	ns
II x III	$2,5 \pm 0,8$ x $0,2 \pm 0,1$	< 0,05

Nota: O valor de p se refere ao teste de *Kruskal-Wallis*. Grupo I (n=7): sem colonização; grupo II (n=9): colonizados por *Staphylococcus aureus*; grupo III (n=10): colonizados *Pseudomonas aeruginosa*. Resultados expressos na forma (média \pm erro padrão); ns: não significativo.

Tabela 4: Tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0) dos grupos.

Comparação	t_0 (min.)	P
I x II	10 ± 2 x 23 ± 4	< 0,05
I x III	10 ± 2 x $9,4 \pm 0,8$	ns
II x III	23 ± 4 x $9,4 \pm 0,8$	< 0,05*

Nota: O valor de p se refere ao teste de *Kruskal-Wallis*. Grupo I (n=7): sem colonização; grupo II (n=9): colonizados por *Staphylococcus aureus*; grupo III (n=10): colonizados *Pseudomonas aeruginosa*. Resultados expressos na forma (média \pm erro padrão); ns: não significativo.

11 DISCUSSÃO

O estudo teve como objetivo verificar e comparar a solubilização do muco brônquico em portadores de FC, colonizados por diferentes bactérias em solução salina isotônica, através da técnica fotoacústica.

A solução salina isotônica foi escolhida porque existem na literatura relatos de que alguns sais, como o cloreto de sódio, têm um bom efeito solubilizador sobre o muco brônquico. O cloreto de sódio pode atuar na degradação de enzimas presentes no muco. Sendo assim, quando a solução salina isotônica interage com uma amostra de muco brônquico, é capaz de solubilizar essa secreção. (POPOV *et al.*, 1995; PIZZICHINI *et al.*, 1999; CATALDO *et al.*, 2001).

Quanto ao processo monitorado através das medidas fotoacústicas, duas hipóteses podem ser mencionadas. A evolução observada no sinal poderia representar: i) evaporação do material analisado (amostra + solução salina isotônica); e ii) o processo de solubilização propriamente dito. No entanto, a primeira hipótese pode ser descartada, pois, para a frequência de modulação utilizada, e assumindo-se difusividade térmica próxima à da água, para o material analisado, o comprimento de difusão térmica do material é da ordem de 40 μ m, enquanto a espessura do material analisado era de 1mm (espessura do recipiente para a amostra). Assim, a eventual evaporação de material da superfície externa da amostra não interferiria no sinal fotoacústico, por ocorrer a grande distância da camada de material efetivamente responsável pelo sinal fotoacústico.

Nas medidas realizadas, foi observado sinal fotoacústico final sempre maior que inicial. Isso pode ser explicado pela solubilização do material: iniciado o processo, a

quantidade de líquido nas amostras aumenta. Na configuração experimental utilizada, com a folha de alumínio entre a luz e a amostra, o sinal fotoacústico depende basicamente das propriedades térmicas da amostra. Como as medidas fotoacústicas sinalizam ocorrência de alteração nas amostras analisadas em função do tempo, durante o procedimento experimental, pode-se afirmar que o processo de solubilização modifica as propriedades térmicas da amostra (ROSENCWAIG, 1982; BARJA *et al.*, 2001; DUMAS, 2004).

Estudos prévios realizados na pele humana mostram que o sinal fotoacústico varia de acordo com o nível de hidratação da amostra devido ao menor comprimento de difusão térmica nas amostras hidratadas. Esses resultados demonstraram que o sinal fotoacústico na pele varia com o nível de hidratação (ROMPE *et al.*, 2005). Outros estudos também descreveram o efeito da hidratação e a relação entre efusividade térmica e a quantidade de água presente na amostra (GUTIÉRREZ-JUÁREZ *et al.*, 2002). De modo geral, pode-se afirmar que a amplitude do sinal fotoacústico aumenta à medida que aumenta o nível de hidratação do material (BARJA, 2003). Isso corrobora a interpretação do aumento do sinal fotoacústico em termos do aumento de hidratação, relacionada ao processo de solubilização nas amostras analisadas.

Passaremos, agora, a considerar os parâmetros avaliados a partir das medidas fotoacústicas: sinal fotoacústico relativo pós-solubilização (S_R), tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0) e intervalo de tempo de solubilização (dt).

Em relação à amplitude relativa do sinal fotoacústico, a Tabela 1 e a Figura 6 mostram aumento do sinal principalmente para as medidas em amostras do grupo I (aumento de 12% no sinal durante o processo de solubilização). Para o grupo II, o sinal fotoacústico passa por

um aumento médio de 7%; para o grupo III, tecnicamente não se pode falar em aumento do sinal, pois o erro (2%) é superior ao aumento verificado (1%).

Ainda sobre a amplitude do sinal fotoacústico, uma análise mais detalhada foi efetuada com a realização de teste *t-Student*, pareado em cada grupo, para avaliar se houve aumento significativo do sinal durante o processo de solubilização. Os resultados obtidos (Tabela 2) mostram ganho significativo de solubilidade tanto para o grupo I (com $p < 0,05$) quanto para o grupo II (com $p < 0,10$), sendo descartado aumento significativo de solubilidade para o grupo III.

Com relação aos parâmetros t_0 e dt , de modo geral, os valores encontrados neste trabalho apresentam correspondência com resultados obtidos no trabalho de Dumas (2004), que avaliou a solubilização do muco brônquico em pacientes com diagnóstico de pneumonia e em voluntários sem doença pulmonar prévia, usando a técnica fotoacústica. Os valores encontrados nas amostras de muco dos pacientes com pneumonia, classificadas como purulentas ($t_0 = 23,3 \pm 5,36$; $dt = 3,41 \pm 1,9$), aproximam-se dos valores obtidos nas amostras colonizadas por *Staphylococcus aureus*, que eram menos purulentas que as colonizadas por *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto, mais purulentas que as sem colonização prévia, apesar de diferenças no protocolo experimental entre os estudos.

Já existe na literatura um estudo prévio que avaliou as mesmas variáveis analisadas no presente estudo para o muco brônquico de portadores de fibrose cística. Entretanto, no estudo de Junqueira, 2006 as cepas de bactérias não foram estratificadas e as amostras foram divididas em três grupos de acordo com o agente solubilizador utilizado que foram: solução salina hipertônica a 3% e 6% e a N-acetilcisteína (JUNQUEIRA, 2006). Deste modo, devido

às diferenças no agente solubilizador utilizado, torna-se difícil a comparação dos resultados entre os dois estudos.

Em relação ao intervalo de tempo de solubilização (dt), ocorreu diferença significativa apenas entre os grupos II e III. No entanto, dada a análise de S_R , é difícil falar em solubilização para as amostras do grupo III. Assim, o que se pode afirmar é que, uma vez iniciado, o processo de solubilização não leva mais do que alguns minutos, tanto para amostras do grupo I quanto para amostras do grupo II. Desse modo, a diferença entre os grupos I e II quanto ao tempo total para solubilização deve ser analisada à luz dos resultados obtidos para t_0 .

No que diz respeito à comparação do tempo de pico da velocidade de solubilização (t_0) entre os grupos, foi observada diferença significativa entre os grupos I e II e entre os grupos II e III. Não se observou diferença entre os grupos I e III; no entanto, não se pode falar em solubilização efetiva para o grupo III (colonizado por *Pseudomonas aeruginosa*). Desse modo, pode-se afirmar que o processo de solubilização demora mais a ser efetivado no grupo colonizado por *Staphylococcus aureus* (t_0 superior a 20 minutos) do que no grupo sem colonização (t_0 em torno de 10 minutos).

Segundo a literatura, *Staphylococcus aureus* é geralmente a primeira bactéria encontrada na cultura das secreções pulmonares de portadores de FC na infância, é freqüentemente isolada em lactentes e contribui para endobronquite precoce. Esse processo inicia uma lesão pulmonar crônica com prejuízos para o parênquima pulmonar, permitindo a colonização subsequente por outros patógenos, principalmente *Pseudomonas aeruginosa*. Portanto, o muco dos pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* possui uma variedade

de fatores de virulência, que alteram o *clearance* mucociliar e, conseqüentemente, podem modificar a viscoelasticidade desse muco (GILLIGAN, 199; SADOWSKA *et al.*, 2002).

Entretanto, apesar das características acima relatadas, no presente estudo, as amostras colonizadas por essa bactéria foram solubilizadas com a utilização da solução salina isotônica. Já as amostras, colonizadas por *Pseudomonas aeruginosa*, não foram sensíveis a essa substância, provavelmente, porque as cepas de *pseudomonas aeruginosa*, associadas à FC, produzem a cápsula de alginato, que confere às colônias um fenótipo bioquimicamente diferente do produzido pela *Staphylococcus aureus*, com alterações significativas dos fluidos brônquicos, aumento das reações inflamatórias e altas atividades de elastase (GILLIGAN, 1991; REIS; DAMACENO, 1998; SADOWSKA *et al.*, 2002).

Pseudomonas aeruginosa tem sido o patógeno mais importante do trato respiratório de portadores de FC. Essa bactéria é comumente isolada no trato respiratório desses pacientes entre 10 e 14 anos de idade. Após essa idade, cerca de 98% dos pacientes serão colonizados por essa bactéria, que é raramente erradicada. Desse modo, *Pseudomonas aeruginosa* é responsável por processos crônicos de bronquite e bronquiolite que alteram significativamente a produção, eliminação e viscosidade da secreção pulmonar, sendo conseqüentemente, responsável pela falência respiratória e deterioração severa do estado clínico dos pacientes (BENTZMANN; ROGER; PUCHELLE, 1996).

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, geralmente, apresentam baixa toxicidade, porém alta densidade no interior da árvore traqueobrônquica. Associada às alterações no *clearance* mucociliar dos portadores de FC, essa alta densidade é responsável pelo aumento da viscosidade do muco brônquico e infecções respiratórias recorrentes (BENTZMANN; ROGER; PUCHELLE, 1996; REIS; DAMACENO, 1998).

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os trabalhos citados, já que a ausência de solubilização efetiva das amostras colonizadas por *Pseudomonas aeruginosa* pode ser atribuída à maior viscoelasticidade das amostras colonizadas por essa bactéria em relação às amostras do grupo colonizado por *Staphylococcus aureus*. Por sua vez, o grupo colonizado por *Staphylococcus aureus* apresentou solubilização efetiva, ainda que em tempo significativamente maior do que aquele obtido no grupo de amostras sem colonização prévia.

12 CONCLUSÃO

Os resultados, encontrados no presente estudo, confirmam a viabilidade da técnica fotoacústica, para estudar processos de solubilização em materiais biológicos. Neste trabalho, foi avaliada a solubilização de amostras extraídas de portadores de FC, utilizando-se solução salina isotônica como agente de solubilização e a técnica fotoacústica como método de monitoramento do processo.

Sabe-se que a ocorrência de FC altera a viscosidade do muco brônquico. Para amostras extraídas dos pacientes fibrocísticos, o presente trabalho mostra diferenças no processo de solubilização de acordo com a presença ou não de colonização no material. Além disso, este estudo mostra que a eficiência do processo de solubilização depende do tipo de colonização. Em particular, os resultados obtidos sugerem que o uso de solução salina isotônica não é indicado para pacientes com colonização por *Pseudomonas aeruginosa*; por outro lado, a solução salina isotônica apresenta eficiência nos casos de portadores de FC sem colonização, ou colonizados por *Staphylococcus aureus*.

Partindo dos resultados aqui apresentados, sugere-se a realização de estudos adicionais com o objetivo de verificar se as diferenças aqui relatadas na solubilização do muco brônquico de portadores de FC persistem com a utilização de fármacos, que provoquem reações químicas ou alterações nas concentrações iônicas desse material no processo de solubilização.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A. et al. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n.5, p. 371-379, 2004.
- ANJOS, F.H. et al. Sunscreen effect in skin analyzed by photoacoustic spectroscopy. **J. Phys IV France**, v.125, p. 797-799, 2005.
- ANDERSON, P.J. History of aerosol therapy: Liquid nebulization to MDIs to DPIs. **Respir Care**, v. 50, n.9, p. 1139-1149, 2005.
- ANDRADE, E. et al. Avaliação evolutiva da espirometria na fibrose cística. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n.3, p. 130-136, 2001.
- BARJA, P.R. Photoacoustics as a tool for diagnosis of radicular stress: Measurements in eucalyptus seedlings. **Rev Sci Instrum.**, v. 74, n.1, p. 709-711, 2003.
- BARJA, P.R. et al. Photosynthesis in Eucalyptus studied by the open photoacoustic technique: Effects of irradiance and temperature. **Acoustical Physics**, v. 47, n.1, p. 22-28, 2001
- BALDERAS-LÓPEZ J.A. et al. Photoacoustic measurements of transparent liquid samples: thermal effusivity. **Meas.Sci technol.**, v. 6, p. 1163-1168, 1995.
- DE BENTZMANN, S; ROGER, P; PUCHELLE, E. Pseudomonas aeruginosa adherence to remodeling respiratory epithelium. **Eur Respir J.**, v. 9, n.10, p. 2145-2150, 1996.
- BERNARDINO, A. et al. CFTR, PRSS1 and SPINK1 Mutations in the development of pancreatitis in brasilian patients. **JOP J Pancreas**, v. 4, n.5, p. 169-177, 2003.
- CATALDO, D. et al. Induced sputum-comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. **Chest**, v. 120, n.6, p. 1815-1817, 2001.
- CAMARGOS, P.A.M; QUEIROZ, M.V.N.P. Pico do fluxo expiratório na avaliação da função pulmonar na fibrose cística. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n.1, p. 45-49, 2002.
- DOLOVICH, M.B. et al. Device selection and outcomes of aerosol therapy: Evidence-based guidelines. **Chest**, v. 127, n.1, p. 335-371, 2005.

DEL DONNO, M. et al. The Effect of inflammation on mucociliary clearance in asthma. **Chest**, v. 118, n.4, p. 1142-1149, 2000.

DUMAS, F.L.V. **Análise do tempo de solubilização do muco brônquico humano em solução salina isotônica por meio da técnica fotoacústica**. 2004. 1 disco laser (Mestrado em Engenharia Biomédicas) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.

FAHY, J.V et al. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 152, n.1, p. 53-58, 1995.

FRACKOWIAK, D. Application on photothermal methods in biophysics and in medicine. **Current Topics in Biophysics**, v. 25, p. 11-18, 2001.

GILBSON, R.L; BURNS, J.L; RAMSEY, B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 168, n.8, p. 918-915, 2003.

GILLIGAN, P.H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 4, n.1, p. 35-51, 1991.

GOVAN J. Infection control in cystic fibrosis: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex. **J R Soc Med.**, v. 93, p. 40- 45 (suppl 38), 2000.

GRUENERT, D.C et al. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments. **J Clin Invest.**, v. 112, n. 5, p. 637-641, 2003.

GUTIERREZ-JUAREZ, G. et al. In vivo measurement of the human skin absorption of topically applied substances by photoacoustic technique. **Physiol Meas.**, v. 23, n.3, p. 1-12, 2002.

HAILDL, P. et al. Inhaled isotonic alkaline *versus* saline solution and radioaerosol clearance in chronic cough. **Eur Respir J.**, v. 16, n.6, p. 1102-1108, 2000.

HARDY, K.A. A review of airway clearance: new techniques, indications, and recommendations. **Respir Care**, v. 39, p. 440- 455, 1994.

HASANI, A. et al. The effect of inhaled tiotropium bromide on lung mucociliary clearance in patients with COPD. **Chest**, v. 125, n.5, p. 1726-1734, 2004.

HEYDER, J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. **Am Thorac Soc.**, v. 1, p. 315-320, 2004.

HO, J. et al. The effect of aging on nasal mucociliary clearance beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 163, n.4, p. 983-988, 2001.

HOUTMEYERS, E. et al. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. **Eur Respir J.**, v. 13, n. 5, p. 1177-1188, 1999.

IBAÑEZ-TALLON, I; HEINTZ, N; OMRAN, H. To beat or to beat: roles of cilia in development and disease. **Human Molecular Genetics**, v. 12, Review Issue 1, p. R27-R35, 2003.

JUNQUEIRA, C. R. A. **Monitoramento da interação de drogas mucoativas em mucobrônquico humano de portadores de fibrose cística por meio da técnica fotoacústica**. 2006. 1 disco laser (Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

KING, M et al. Rheology of cystic fibrosis sputum after *in vitro* treatment with hypertonic saline alone and in combination with recombinant human deoxyribonuclease. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 156, n.1, p. 173-177, 1997.

KING, M. Experimental models for studying mucociliary clearance. **Eur Respir J.** v. 11, n.1, p. 222-228, 1998.

KING, M. Effect of particles on mucus and mucociliary clearance. In: GEHR, P; HEYDER, J. **Lung biology in health and disease: Particle Lung Interactions**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 521-529.

KLINGER, J.D; TANDLER, B; LIEDTKT, C.D; BOAT, T.F. Proteinases of *Pseudomonas aeruginosa* evoke mucin release by tracheal epithelium. **J. Clin. Invest.**, v. 74, n.5, p. 1669-1678, 1984.

KNOWLES, M.R; BOUCHER, R.C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. **J Clin Invest.**, v. 109, n.5, p. 571-577, 2002.

RESNICK, R; HALLIDAY, D. **Fisica II**. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos, 2003. p. 399.

RUBIN, B.K. Physiology of airway mucus clearance. **Respir Care**, v. 47, n.7, p. 761-768, 2002.

LILLEHOJ, E.R; KIM, K.C. Airway mucus: its components and function. **Arch Pharm Res.**, v. 25, n.6, p. 770-780, 2002.

LIMA, L.D. et al. Photoacoustic monitoring of Methylene blue irradiated. **J Phys IV France**, v. 125, p. 781-783, 2005.

LOBATO, C. A; BARJA, P.R; RODRIGUES, M.R. Estudo fotoacústico da polimerização de resinas odontológicas. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVAP, 6, 2006, São José dos Campos, SP. Revista UNIVAP **Anais de Trabalhos Completos - X INIC e VI EPG 2006**. São José dos Campos: UNIVAP, 2006. v. 13, n.24, p 19.

LORENZI, G. et al. Correlation between rheologic properties and *in vitro* ciliary transport of rat nasal mucus. **Biorheology**, v. 29, n.4, p. 433-440, 1992.

MACCHIONE, M. et al. Methods for studying respiratory mucus and mucus and clearance. **Braz J of Med and Biol Res.**, v. 28, p. 1347-1355, 1995.

MARKS, M.I. Clinical significance of Staphylococcus aureus in cystic fibrosis. **Infection**. v. 18, n.1, p. 53-56, 1990.

MORGAN, L. et al. Scintigraphic measurement of tracheal mucus velocity *in vivo*. **Eur Respir J.**, v. 23, n.4, p. 518-522, 2004.

OUT, T.A; JANSEN H.M; LUTTER, R. Methodological aspects in the analysis of spontaneously produced sputum. **Monaldi Arch Chest Dis.**, v. 56, n.6, p. 493-499, 2001.

PAUL, K. et al. Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patient with cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 169, n.6, p. 719-725, 2004.

PLOTKOWSKI, M.C; BAJOLET-LAUDINAT, O; PUCLELLE E. Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa. **Eur Respir J.**, v. 6, n.1, p. 903-916, 1993.

PINET, C. et al. Function and bulk of respiratory and limb muscles in patients with cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 168, n8, p. 989-994, 2003.

PIZZICHINI, M.M et al. Prednisone dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum. **Eur Respir J.**, v. 13, n.1, p. 15-21, 1999.

POPOV, T.A. et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. **Eur Respir J.**, v. 8, n.4, p. 559-565, 1995.

PUCHELLE, E; BAJOLET, O; ABELY, M. Airway mucus in cystic fibrosis. **Paediatric Respir Rev.**, v. 3, n.2, p. 115-119, 2002.

PUCHELLE, E; ZAHM, J.M. Rheological properties other than viscoelasticity and adhesivity. In: BRAGA, P.C; ALLEGRA, L. **Methods in bronchial mucology**. New York: Raven Press, 1988, p. 135-139.

RAU, J.L. The Inhalation of drugs: Advantages and problems. **Respir Care**, v. 50, n.3, p. 367-382, 2005.

RATJEN, F; DORING, G. Cystic fibrosis. **Lancet**, v. 361, n. 9358, p. 681-683, 2003.

REIS, F.J.C; DAMACENO, N. Fibrose Cística. **Jornal de Pediatria**, supl 1, p. s76-s77; s81-s83, 1998.

ROBBINS, S.L et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 1251 p.

ROMPE, P.C.B et al. Characterization of human skin through photoacoustic spectroscopy. **J Phys IV France**, v.125, p. 785-787, 2005.

ROSENCWAIG, A. **Thermal processes**. In: _____. Photoacoustic and photoacoustic spectroscopy. New York, John Wiley & Sons, 1980. p. 265-284.

ROSENCWAIG, A. Potential clinical applications of photoacoustic. **Clin Chem.**, v. 28, n.9, p. 1878-1881, 1982.

ROSENCWAIG, A; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. **J Appl Phys.**, v. 47, p. 64-69, 1976.

ROSENSTEIN, B.J; CUTTING, C.R. The diagnostic of cystic fibrosis: A consensus statement. **J Pediatr.**, v. 132, n.4, p. 589-595, 1998.

ROSSI, R.C.P; BARJA, P.R. Estudo fotoacústico das propriedades de penetração de Arnica Montana de uso tópico na pele humana. In: ENVIRONMENTAL AND HEALTH WORLD CONGRESS - EHWC, 2006, Santos, SP. **Proceedings...** 2006. v. 1, p. 328-331.

SADOWSKA, B. et al. Characteristics of staphylococcus aureus, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 32, n.3, p. 191-197, 2002.

SALDIVA, P.H.N. Bases anatômicas e funcionais do trato respiratório. In: _____. **Doenças pulmonares em pediatria: diagnóstico e tratamento.** São Paulo: Atheneu, 1999, p. 3-19.

SOOD, N. et al. Increasing concentration of inhaled saline with or without amiloride: Effect on mucociliary clearance in normal subjects. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 167, n.2, p. 158-163, 2003.

TARRAN, R. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. **Am Thorac Soc.**, v. 1, n.1, p. 42-46. 2004.

VAN DER SCHANS, C.P. et al. Airway clearance techniques. In: AMBROSINO, N; DONNER, C. F; RAMPULLA, C. **Advances in Rehabilitation-Topics in Pulmonary Rehabilitation.** [s.l.]: Mageri Foudation Books and PI-ME Press, 1999. v. 7, p. 229-241.

VARGAS, H; MIRANDA L.C.M. Photoacoustic and related photothermal techniques. **Phys Rep.**, v. 161, p. 43-101, 1988.

WAGENER, J.S.; HEADLEY, A.A. Cystic Fibrosis: Current Trends in Respiratory Care. **Respir Care**, v. 48, n.3, p. 234-245, 2003.

WIDDICOMBE, JH; WIDDICOMBE J.G. Regulation of human airway surface liquid. **Respir Physiol.** v. 99, n.1, p. 3-12, 1995.

WILSON, R.; DOWLING, AD; JACKSON, A.D. The biology of bacterial colonization and invasion on the respiratory mucosa. **Eur. Respir J.**, v. 9, n.7, p. 1523-1530, 1996.

ZIN, W.A; ROCCO, P.R.M. Mecanismos de defesa das vias aéreas. In: **Fisiologia.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 549-552.

ANEXOS

ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L137/2005/CEP, sobre “*Análise do tempo de solubilização do muco brônquico em pacientes portadores de Fibrose Cística colonizados por diferentes bactérias*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Vicente F. de Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 28 de setembro de 2005

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Univap

ANEXO B: Termo de Consentimento Livre Esclarecido

1- Nome do projeto de pesquisa: ANÁLISE DO TEMPO DA SOLUBILIZAÇÃO DO MUCO BRÔNQUICO EM PACIENTES PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA COLONIZADOS POR DIFERENTES BACTÉRIAS

2- Pesquisador principal:

Cristiane Cenachi Coelho. Fisioterapeuta Professora do Uni-BH e PUC-Minas-Betim Tel: 31- 333771336

3- Objetivos:

Esta é uma pesquisa que pretende estudar a diferença das secreções do pulmão de pacientes portadores de fibrose cística, colonizados por diferentes bactérias.

4- Procedimentos:

Esta pesquisa avaliará crianças portadoras de fibrose cística. Todos os pacientes selecionados realizarão entrevista, exame físico e sessões de fisioterapia respiratória. Caso os pacientes sejam menor de idade poderão ser acompanhados pelos pais ou responsáveis. Os participantes poderão desistir de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum problema e nenhuma mudança nos outros tratamentos que estiver realizando.

Todos os exames serão realizados gratuitamente. Atestados de presença serão fornecidos, se houver necessidade, para justificar a ausência no trabalho ou na escola.

5- Benefícios:

Este trabalho é importante, pois a análise da secreção pulmonar de pacientes portadores de fibrose cística colonizados por diferentes bactérias poderá ajudar a descobrir se estas bactérias alteram a espessura do muco de maneiras diferentes. Os resultados desta pesquisa poderão ajudar a criar novas formas de tratamentos para estes pacientes.

6- Risco e desconforto:

Os procedimentos que serão utilizados para a realização da sessão de fisioterapia respiratória e na coleta da secreção pulmonar já são procedimentos frequentemente utilizados na prática clínica e não oferecerão nenhum risco para os voluntários. O

desconforto poderá acontecer no momento da coleta da secreção, pois o voluntário terá de tossir e expectorar para que o examinador possa colher o material.

7- Participação voluntária/desistência:

A participação neste estudo é voluntária. Você pode recusar a participação a qualquer momento.

Sendo assim pedimos a permissão para participação de _____
_____ neste estudo.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário/responsável: _____

Testemunha

Testemunha

Declaro que expliquei os objetivos deste estudo ao responsável, dentro dos limites dos meus conhecimentos científicos.

Pesquisador responsável

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)