



Influência da idade e do gênero no perfil de compostos orgânicos voláteis exalados analisados por nariz eletrônico

Silvano Dragonieri¹, Vitaliano Nicola Quaranta¹, Pierluigi Carratu¹,
Teresa Ranieri¹, Onofrio Resta¹

1. Disciplina di Malattie dell'Apparato Respiratorio, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso, Scuola di Medicina, Università degli Studi di Bari, Bari, Italia.

Recebido: 20 agosto de 2015.

Aprovado: 30 novembro 2015.

Trabalho realizado na Disciplina di Malattie dell'Apparato Respiratorio, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso, Scuola di Medicina, Università degli Studi di Bari, Bari, Italia.

RESUMO

Objetivamos investigar os efeitos da idade e do gênero no perfil de compostos orgânicos voláteis exalados. Avaliamos 68 adultos saudáveis nunca fumantes, comparando-os pela idade e gênero. Analisamos amostras de ar exalado por um nariz eletrônico, o que resultou em "breathprints". A análise dos principais componentes e a análise discriminante canônica mostraram que não houve distinção dos *breathprints* entre indivíduos mais velhos (≥ 50 anos) e mais jovens e nem entre homens e mulheres (acurácia com validação cruzada de 60,3% e 57,4%, respectivamente). Portanto, idade e gênero parecem não afetar o perfil global de compostos orgânicos voláteis exalados medidos por nariz eletrônico.

Descritores: Testes respiratórios; Compostos orgânicos voláteis; Nariz eletrônico.

Desde a descoberta dos narizes eletrônicos (também conhecidos como *e-noses*) e de sua aplicação na determinação do perfil do ar exalado (isto é, criação de *breathprints*), grandes avanços têm sido feitos com relação à discriminação de doenças por meio da comparação de *breathprints* globais. Inúmeros estudos mostram o potencial de aplicação da determinação do perfil de compostos orgânicos voláteis (COVs) em três classes de doenças respiratórias: câncer de pulmão, infecções respiratórias e doenças pulmonares obstrutivas. Após a comprovação da capacidade dos narizes eletrônicos em farejar essas doenças, levantou-se a questão do que constitui os marcadores exalados dessas patologias. Como os narizes eletrônicos avaliam a mistura global de COVs no ar exalado, nenhum marcador primário discriminativo pode ser especificado com sendo sugestivo das vias fisiopatológicas envolvidas. Além disso, é necessário identificar e corrigir prováveis fontes de interferência do sinal, pois são potencialmente fatores de confusão.⁽¹⁾ O perfil de COVs exalados pode ser influenciado por fatores associados à doença, como o calibre e a inflamação das vias aéreas; fatores associados ao tratamento, como o uso de medicações; e fatores associados ao paciente, como idade, gênero, comorbidades, gravidez, dieta e tabagismo.⁽²⁾ Com relação a idade e gênero, sabe-se que esses dois fatores alteram os níveis de COVs.⁽²⁾ Estudos anteriores sobre a determinação do perfil do ar exalado, utilizando-se nariz eletrônico, em várias doenças sugerem que a idade não afeta o perfil global de COVs.^(3,4) Porém, até onde sabemos, não há estudos que abordem especificamente a análise de biomarcadores exalados, utilizando-se nariz eletrônico, com relação a diferenças de idade e gênero em indivíduos saudáveis. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos

da idade e do gênero nos perfis de COVs do ar exalado, analisados por nariz eletrônico, em uma população de adultos saudáveis.

Neste estudo transversal, as amostras de ar exalado foram obtidas de 68 adultos saudáveis entre 20 e 68 anos de idade. Os participantes eram voluntários recrutados entre os membros de uma equipe hospitalar. Selecionou-se um número igual de indivíduos < 50 anos de idade ($n = 34$) e ≥ 50 anos de idade ($n = 34$). Dos 68 voluntários, 32 (47,1%) eram do sexo masculino. Todos eram nunca fumantes, nenhum tinha história de sintomas torácicos, e todos estavam livres de qualquer doença conhecida. Todos apresentavam $VEF_1 > 70\%$ do valor previsto e relação $VEF_1/CVF > 80\%$. Nenhum havia apresentado infecções do trato respiratório superior ou inferior nas 4 semanas anteriores ao estudo. A amostra estudada foi avaliada por grupo etário (< 50 vs. ≥ 50 anos de idade) e por gênero. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Bari, na cidade de Bari, Itália (Protocolo nº 46403/15), e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Todas as medições foram obtidas durante uma única visita. Foi solicitado aos indivíduos que evitassem comer e beber, bem como realizar exercício físico vigoroso, durante pelo menos 3 h antes da visita.

A espirometria foi realizada por um técnico de função pulmonar treinado, de acordo com as recomendações mais recentes da *European Respiratory Society*,⁽⁵⁾ e o equipamento (MasterScreen Pneumo; Jaeger; Würzburg, Alemanha) foi calibrado diariamente. Para todos os indivíduos, foram medidos o VEF_1 e a CVF. A análise do ar exalado foi realizada conforme descrito anteriormente.⁽³⁾

Endereço para correspondência:

Silvano Dragonieri. Disciplina di Malattie dell'Apparato Respiratorio, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso, Scuola di Medicina, Università degli Studi di Bari, Piazza Giulio Cesare, 11, 70124, Bari, Italia.
Tel.: 39 080 559-3215. Email: silvano.dragonieri@uniba.it
Apoio financeiro: Nenhum.

Em resumo, após 5 min de respiração corrente através de uma válvula de não reinalação de 3 vias conectada a um filtro de COVs inspiratório (A2; North Safety, Middelburg, Holanda), os indivíduos expiraram um único volume da capacidade vital em um saco Tedlar conectado a um nariz eletrônico.

Utilizou-se um nariz eletrônico portátil, disponível comercialmente (Cyranose 320; Smith Detections, Pasadena, CA, EUA), com arranjo de nanocompósitos com 32 sensores de polímero orgânico. Quando os sensores são expostos a uma mistura de COVs, os polímeros incham, induzindo uma alteração de sua resistência elétrica. Os dados brutos são capturados como alterações da resistência de cada um dos 32 sensores em um banco de dados *onboard*, produzindo um perfil de distribuição (*breathprint*) que descreve a mistura de COVs e pode ser analisado com algoritmos de reconhecimento de padrões.⁽⁶⁾

O tamanho da amostra foi estimado com base em dados de estudos anteriores.^(3,4,7) Calculou-se o tamanho da amostra estimando-se o erro-padrão da porcentagem de pacientes classificados corretamente:

$$ep = \sqrt{C(100 - C)/n}$$

onde *ep* é o erro-padrão, *C* é a porcentagem de pacientes classificados corretamente e *n* é o tamanho estimado da amostra. A confiabilidade da porcentagem de classificação correta depende do erro-padrão, que é ele próprio uma função de *p*. Se a porcentagem de pacientes classificados corretamente se situa entre 50% e 75%, os tamanhos amostrais atuais por subgrupo fornecem erros-padrão entre 8% e 9%. Os dados brutos foram analisados com o *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados foram reduzidos a um conjunto de componentes principais que capturaram a maior quantidade de variância dos 32 sensores originais. Para a seleção dos principais componentes que melhor discriminaram entre os grupos, utilizou-se ANOVA de uma via. Mais tarde, esses componentes principais foram então utilizados em uma análise discriminante canônica (ADC) para a classificação dos casos em partições categóricas. Utilizando-se a método "leave-one-out", calculou-se a acurácia com validação cruzada, que é expressa em porcentagem. A acurácia com validação cruzada fornece uma estimativa da acurácia do desempenho de um modelo preditivo na prática. Para cada caso, a probabilidade de diagnóstico positivo foi calculada com base na função discriminante canônica linear.

As características da população estudada total e segundo grupo etário estão descritas na Tabela 1.

Não foram encontradas diferenças significativas para o VEF₁, embora tenha havido uma ligeira diferença entre os dois grupos etários quanto ao IMC. O gráfico bidimensional da análise dos componentes principais mostrou que não houve distinção dos *breathprints* entre indivíduos mais velhos e mais jovens (Figura 1).

A ADC desses dados apresentou acurácia com validação cruzada de 60,3%, indicando que as diferenças não foram significativas. Da mesma forma, não houve distinção dos *breathprints* entre homens e mulheres (Figura 1), sendo que a ADC apresentou acurácia com validação cruzada de 57,4%, também indicando diferença não significativa.

Nossos resultados sugerem que, embora o envelhecimento modifique os componentes individuais do ar exalado, o perfil global de COVs medidos por nariz eletrônico não difere entre os grupos etários. Da mesma forma, o gênero parece não ter influência no espectro de COVs exalados. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a abordar especificamente biomarcadores exalados analisados por nariz eletrônico, com relação a idade e gênero em indivíduos saudáveis bem caracterizados. Pesquisas sobre dessemelhanças metabólicas específicas de idade e gênero são essenciais para o entendimento do fenótipo fisiológico e metabólico de indivíduos saudáveis. Sabe-se que o número de neutrófilos no escarro induzido aumenta com o avançar da idade,^(8,9) assim como o faz a relação de linfócitos CD4+/CD8+ no LBA.⁽¹⁰⁾ Esses dados são compatíveis com os de estudos que mostram que, com o envelhecimento, o estresse oxidativo aumenta e o *clearance* do citocromo p450 diminui.⁽¹¹⁾ Além disso, diversos estudos mostram perfis metabômicos específicos de gênero em urina e soro de indivíduos saudáveis.⁽¹²⁾ Porém, há poucos estudos enfocando o ar exalado por humanos. Ademais, estudos empregando análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa demonstram que há alterações relacionadas à idade no perfil de COVs do ar exalado em indivíduos saudáveis.⁽¹³⁾ Bikov et al. encontraram uma correlação significativa entre *breathprints* analisados por nariz eletrônico e idade apenas em pacientes com câncer de pulmão.⁽⁷⁾ Por outro lado, estudos mostram que a capacidade de um nariz eletrônico em distinguir entre controles saudáveis, indivíduos com asma e indivíduos com DPOC não é influenciada por diferenças de idade.^(3,4) Apenas alguns estudos identificaram COVs específicos de gênero no ar exalado por humanos, analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.^(14,15) Um estudo muito recente utilizando nariz eletrônico mostrou que o gênero tem efeito na

Tabela 1. Características clínicas de uma amostra de adultos saudáveis nunca fumantes.^a

Características	Todos os indivíduos (n = 68)	< 50 anos de idade (n = 34)	≥ 50 anos de idade (n = 34)	p*
Gênero feminino, n (%)	36 (52,9)	7 (20,6)	12 (35,3)	-
Idade (anos)	43,2 ± 11,3	33,1 ± 8,0	55,6 ± 4,7	< 0,01
VEF ₁ (% do previsto)	104,7 ± 11,8	106,2 ± 11,3	103,3 ± 12,3	ns
IMC (kg/m ²)	25,25 ± 3,3	24,8 ± 3,8	25,7 ± 2,9	< 0,05

^aValores expressos em média ± dp, exceto onde indicado. *ANOVA entre os dois grupos.

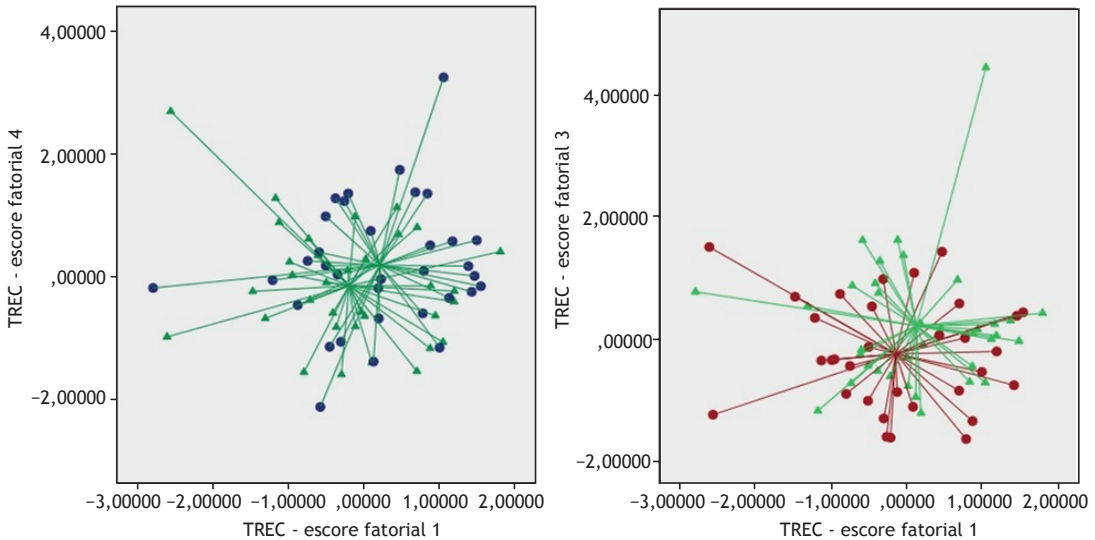


Figura 1. Gráfico bidimensional da análise dos componentes principais, mostrando que não há distinção dos perfis do ar exalado (*breathprints*) entre indivíduos ≥ 50 anos de idade (à esquerda, triângulos) e indivíduos < 50 anos de idade (à esquerda, círculos). Da mesma forma, não houve distinção dos *breathprints* entre indivíduos do sexo masculino (à direita, círculos) e indivíduos do sexo feminino (à direita, triângulos). TREC: taxa de crescimento elementar relativa.

classificação de *breathprints* em fumantes de alto risco.⁽¹⁶⁾

Como se podem explicar nossos resultados? O ar exalado por humanos contém mais de 3.000 COVs decorrentes de mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos que operam por meio de vias metabólicas.⁽⁸⁾ Em concordância com os achados de estudos anteriores, nossos dados sugerem que, apesar da presença de COVs específicos de idade e gênero no ar exalado por

humanos saudáveis, o perfil global de COVs parece não ser influenciado nem pela idade, nem pelo gênero.

Quais são as implicações de nossos achados? Nossos resultados indicam que o pareamento cuidadoso por idade e gênero pode não ser necessário em futuros estudos comparativos. Contudo, mais estudos com populações maiores são necessários para confirmar nossos achados e investigar outros possíveis fatores de confusão, como gravidez, medicação, dieta e tabagismo.

REFERÊNCIAS

- Friedrich MJ. Scientists seek to sniff out diseases: electronic "noses" may someday be diagnostic tools. *JAMA*. 2009;301(6):5856. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2009.90>
- van der Schee MP, Paff T, Brinkman P, van Aalderen WM, Haarman EG, Sterk PJ. Breathomics in lung disease. *Chest*. 2015;147(1):224-31. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.14-0781>
- Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, Le Cessie S, Gauw SA, Spanevello A, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):856-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2007.05.043>
- Fens N, de Nijs SB, Peters S, Dekker T, Knobel HH, Vink TJ, et al. Exhaled air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD. *Eur Respir J*. 2011;38(6):1301-9. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00032911>
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardization of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26(2):319-38. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.05.00034805>
- Röck F, Barsan N, Weimar U. Electronic nose: current status and future trends. *Chem Rev*. 2008;108(2):705-25. <http://dx.doi.org/10.1021/cr068121q>
- Bikov A, Hernadi M, Korosi BZ, Kunos L, Zsomboki G, Sutto Z, et al. Expiratory flow rate, breath hold and anatomic dead space influence electronic nose ability to detect lung cancer. *BMC Pulm Med*. 2014;14:202. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-14-202>
- Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw AJ, et al. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest*. 2004;126(6):1811-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0012-3692\(15\)31427-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0012-3692(15)31427-6)
- Malerba M, Balbi B, Spanevello A. Aging and induced-sputum cells. *Chest*. 2005;128(6):4049-50. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.128.6.4049>
- Meyer KC, Ershler W, Rosenthal NS, Lu XG, Peterson K. Immune dysregulation in the aging human lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(3):1072-9. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.153.3.8630547>
- Scheller U, Zimmer T, Kärger E, Schunck WH. Characterization of the n-alkane and fatty acid hydroxylating cytochrome P450 forms 52A3 and 52A4. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(2):245-54. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1996.0170>
- Jain RB. Distributions of selected urinary metabolites of volatile organic compounds by age, gender, race/ethnicity, and smoking status in a representative sample of U.S. adults. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40(2):471-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.07.018>
- Philips M, Cataneo RN, Greenberg J, Gunawardena R, Naidu A, Rahbari-Oskoui F. Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress. *J Lab Clin Med*. 2000;136(3):243-9. <http://dx.doi.org/10.1067/mlc.2000.108943>
- Ben-Zaken Cohen S, Paré PD, Man SF, Sin DD. The growing burden of chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer in women: examining sex differences in cigarette smoke metabolism. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(2):113-20. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200611-1655PP>
- Das MK, Bishwal SC, Das A, Dabral D, Varshney A, Badireddy VK, et al. Investigation of gender-specific exhaled breath volatome in humans by GCxGC-TOF-MS. *Anal Chem*. 2014;86(2):1229-37. <http://dx.doi.org/10.1021/ac403541a>
- McWilliams A, Beigi P, Srinidhi A, Lam S, MacAulay CE. Sex and Smoking Status Effects on the Early Detection of Early Lung Cancer in High-Risk Smokers Using an Electronic Nose. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2015;62(8):2044-54. <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2015.2409092>