

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA
MESTRADO EM FISIOTERAPIA**



LARISSA BOUWMAN SAYÃO

**ACURÁCIA DA FRAÇÃO EXALADA DO ÓXIDO NÍTRICO NO
DIAGNÓSTICO DE SIBILÂNCIA RECORRENTE E NÃO
RECORRENTE EM CRIANÇAS PRÉ-ESCOLARES**

RECIFE | 2015

LARISSA BOUWMAN SAYÃO

**ACURÁCIA DA FRAÇÃO EXALADA DO ÓXIDO NÍTRICO NO
DIAGNÓSTICO DE SIBILÂNCIA RECORRENTE E NÃO
RECORRENTE EM CRIANÇAS PRÉ-ESCOLARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Linha de Pesquisa: instrumentação e intervenção fisioterapêutica

Orientador: Prof^o Dr^o Murilo Carlos Amorim de Britto

Coorientadora: Prof^a Dr^a Armèle Dornelas de Andrade

RECIFE | 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S132a Sayão, Larissa Bouwman.
Acurácia da fração exalada do óxido nítrico no diagnóstico de sibilância recorrente e não recorrente em crianças pré-escolares / Larissa Bouwman Sayão. – Recife: O autor, 2015.
127 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Murilo Carlos Amorim de Britto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Sensibilidade e especificidade. 2. Sons respiratórios. 3. Óxido nítrico. 4. Criança. I. Britto, Murilo Carlos Amorim de (Orientador). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-189)

“ACURÁCIA DA FRAÇÃO EXALADA DO ÓXIDO NÍTRICO NO DIAGNÓSTICO DE SIBILÂNCIA RECORRENTE E NÃO RECORRENTE EM CRIANÇAS PRÉ-ESCOLARES”

LARISSA BOUWMAN SAYÃO

APROVADA EM: 30/03/2015

ORIENTADOR: PROF. DR. MURILO CARLOS AMORIM DE BRITTO

COORIENTADORA: PROF.^a DR.^a ARMÊLE DORNELAS DE ANDRADE

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF^a DR.^a ANDREA LEMOS BEZERRA DE OLIVEIRA – FISIOTERAPIA/UFPE

PROF. DR. DÉCIO MEDEIROS PEIXOTO – MATERNO INFANTIL/UFPE

PROF^a DR.^a ARZU ARI – DEPARTMENT OF PHYSIOTHERAPY/GEORGIA STATE UNIVERSITY

Visto e permitida à impressão

Coordenadora do PPGFISIOTERAPIA/DEFISIO/UFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. Desde pequena eu sempre tive a certeza de que tudo que acontece na minha vida é por decisão Dele, e se fui desafiada a enfrentar o mestrado neste momento, o fiz com o coração tranquilo justamente por saber que Ele estaria comigo durante todo o tempo, me fortalecendo, me acalmando e me guiando a cada obstáculo e tomada de decisão. Minha vida só tem sentido porque sei o quanto Ele está ao meu lado.

Aos meus pais que tanto amo, Mártlei Sayão e Renata Cavalcanti, que me educaram na base do amor, confiança e verdade. Ensinaram-me a valorizar a vida e aproveitá-la de forma leve, mas intensa. Aos meus irmãos Bárbara Sayão, Mártlei Sayão Filho e Gabriel Bandeira, capazes de me entender com um olhar e transmitir toda força que preciso em apenas um abraço.

Ao meu alicerce, minha inspiração, meu exemplo e minha força: Minha Voinha Luzia Sayão. Ela que esteve ao meu lado nas madrugadas adentro, que me apoia até nas decisões mais inusitadas, que não nega um sorriso, que está sempre pronta pra um abraço, que transborda amor, que me faz a netinha mais linda e amada de todas, que é minha parceira de TODAS as horas. Vó, eu não seria quem sou sem sua presença na minha vida. Sou muito grata por tudo que sempre fez e faz por mim, as palavras me faltam para expressar tamanha gratidão.

A todos os meus familiares, Tios, Tias, Padrinho, Madrinha, primos e primas, amigas de infância e de faculdade, todos vocês contribuíram com o que sou hoje. Posso falar com toda certeza: eu sou muito sortuda por ter vocês em minha vida!

Ao meu namorado, futuro marido e futuro pai dos meus filhos. Márcio Menezes, você chegou para somar, sem dúvida. Ao seu lado me sinto forte, segura, amada e muito feliz! Muito obrigada pelo incentivo no momento da seleção do mestrado, pela cumplicidade, pela confiança, respeito e apoio em tudo. Amo você.

Aos meus amigos da turma V, eles tornaram os dias carregados de aula, os mais felizes, eles me fizeram enxergar formas diferentes de admiração. Em especial, os meus amigos de labuta: Jasiel Frutuoso, Adriane Cardim, Marcelly Kellyane e Caio Moraes. Nossos esforços em produção e reconhecimento para o laboratório de

Fisioterapia Cardiopulmonar não foram em vão, meus queridos. Vocês estarão guardados no meu coração para sempre.

Ainda falando de laboratório, não posso esquecer todos os meus amigos que o compõem: Catarina, Jacqueline, Taciano, Helga, Sandra, Sostynis, Filipe, Amanda, Helen, Jéssica, Adília, assim como os mestres: Cyda Reinaux, Shirley Campos, Daniella Cunha, Patrícia Marinho, Etiene Fittipaldi e Valdecir Galindo. Todos vocês me ajudaram muito e transmitiram muita energia boa durante todo o período do mestrado, tornando essa jornada algo bem mais tranquilo e prazeroso do que imaginei. Obrigada por tudo!

Aos meus orientadores, Professor Murilo Britto e Professora Armèle Dornelas, muito obrigada pela confiança e pelo acolhimento e ensinamentos.

Agradeço profundamente cada mãe que parou para me ouvir e se dispôs a participar da pesquisa, mesmo naqueles dias em que o tempo estava apertado para ir ao trabalho. A cada criança linda e encantadora que iluminava os meus dias com sorrisos sinceros e inocentes. Elas me deram força para seguir adiante e não fraquejar. Saber que encontraria criaturinhas espontâneas e felizes a cada manhã de coleta me dava forças para levantar cedo todos os dias. Muito obrigada meus pequenos! Agradeço também a minha companheira Edjane, nossa parceria foi muito produtiva.

Enfim, agradeço aos professores do Programa, à secretaria: Niége, Carol e Rafael, aos funcionários do departamento, a CAPES e a todos que um dia passaram na minha vida e por motivos mil não permaneceram, tenham certeza que de algum forma vocês me fizeram uma pessoa melhor.

“Não perca a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente, crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência, tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do Céu permanecerá. De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo”.

Chico Xavier

RESUMO

A sibilância é um sintoma respiratório comum na prática pediátrica e sua recorrência durante a infância relaciona-se com o acometimento inflamatório das vias aéreas. Com objetivo de alcançar a quantificação da inflamação eosinofílica em crianças pequenas, a fração exalada de óxido nítrico (FENO) vem sendo utilizada mundialmente por se tratar de um método fácil e não invasivo. No entanto, ainda são escassas as informações sobre a acurácia diagnóstica desta medida na idade pré-escolar. Esta dissertação está estruturada sob a forma de três artigos originais. O primeiro trata-se de uma revisão sistemática realizada com objetivo de avaliar a acurácia da FENO no diagnóstico de asma infantil pelo padrão-ouro da espirometria. Os resultados mostram que o melhor ponto de corte para diagnóstico de asma em crianças de 5–18 anos é de ≥ 19 partes por bilhão (ppb), enquanto que para o diagnóstico de asma atópica nessa mesma faixa etária é de ≥ 22 ppb. Outros estudos são necessários, com amostras baseadas em cálculo amostral, para padronizar os pontos de corte ideais em diferentes subgrupos etários. O segundo artigo desta dissertação foi realizado com objetivo de avaliar a acurácia diagnóstica da FENO quanto aos tipos de sibilância. Para isso, 423 pais de pré-escolares (3-5 anos) provenientes de creches e escolas públicas responderam a um questionário de doenças respiratórias, e posteriormente, seus filhos foram avaliados quanto à medida da FENO. Observou-se que o valor médio da FENO diferiu entre os grupos de sibilantes e o ponto de corte de 6 ppb foi o que melhor apresentou acurácia para discriminar sibilantes de não sibilantes (RV+= 4,1; IC 95%= 3,07-5,72) enquanto que o ponto de corte de 10 ppb foi o melhor para discriminar sibilantes recorrentes de não recorrentes (RV+= 3; IC 95%= 1,96- 4,68). Para os dois pontos houve aumento da probabilidade pós-teste estimada pelas razões de verossimilhança. As informações advindas do questionário resultaram no terceiro artigo original, que teve como objetivo identificar os possíveis fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da sibilância. Entre as variáveis investigadas aquelas que compuseram o modelo de regressão logística foram: valor de FENO ≥ 10 ppb (OR= 11,6; IC 95%= 5,1-26,6; $p < 0,0001$), uso de oxigênio ao nascimento (OR= 2,8; IC 95%= 1,3-6,2; $p = 0,008$), internação hospitalar por doença pulmonar até os dois anos (OR= 7,1; IC 95%= 4,0-12,5; $p < 0,0001$), dermatite atópica (OR= 2,1; IC 95%= 1,2-3,9; $p = 0,010$) e rinite alérgica (OR= 2,1; IC 95%= 1,3-3,5; $p = 0,002$). A probabilidade estimada para desenvolver sibilância com todos os fatores presentes foi de 99,5%, enquanto que foram observados 15,7% de chance na ausência dos fatores mencionados. Dessa forma, o valor de FENO pode ser uma alternativa útil para o diagnóstico e rastreamento de crianças com risco para sibilância.

Palavras-chave: Sensibilidade e Especificidade. Sons Respiratórios. Óxido Nítrico. Criança.

ABSTRACT

Wheezing is a common respiratory symptom in pediatric practice and its recurrence during childhood is related to the inflammatory airway impairment. In order to achieve the quantification of eosinophilic inflammation in young children, the fraction of exhaled nitric oxide (FeNO) has been used worldwide for it is an easy and non-invasive method. However, there is still little information on the diagnostic accuracy of this measure in the pre-school age. This dissertation is structured in the form of three original articles. The first is a systematic review to evaluate the accuracy of FeNO in the diagnosis of childhood asthma by the gold standard spirometry. The results show that the best cutoff value for the diagnosis of asthma in children 5-18 years is ≥ 19 parts per billion (ppb), while for the diagnosis of atopic asthma that is the same age ≥ 22 ppb. Further studies are needed, with samples based on sample size calculation to standardize the ideal cutoff points for different age subgroups. The second article of this work was carried out to evaluate the diagnostic accuracy of FeNO in the types of wheezing. For this, 423 parents of preschoolers (3-5 years) from day care centers and public schools answered a questionnaire of respiratory diseases, and later, their children were evaluated for measurement of FeNO. It was observed that the average of FeNO differ between the wheezing groups and the cutoff point of 6 ppb was the best prove accurate to discriminate wheezing and non-wheezing (LR+= 4.1; 95% CI = 3.07- 5.72) while the cut-off point of 10 ppb was the best to discriminate recurrent wheezing non-recurrent wheezing (LR+= 3; 95% CI = 1.96 4.68). For the two points there was an increase of the estimated post-test probability for likelihood ratios. The information of the questionnaire resulted in the third original article, which aimed to identify possible risk factors related to the development of wheezing. Among the variables investigated those who composed the logistic regression model were: value of FeNO ≥ 10 ppb (OR = 11.6, 95% CI = 5.1 to 26.6; $p < 0.0001$), use of oxygen to the birth (OR = 2.8; 95% CI = 1.3 to 6.2; $p = 0.008$), hospitalization for pulmonary disease up to two years (OR = 7.1; 95% CI = 4.0 to 12 , 5, $p < 0.0001$), atopic dermatitis (OR = 2.1; 95% CI = 1.2 to 3.9; $p = 0.010$) and allergic rhinitis (OR = 2.1; 95% CI = 1 , 3-3.5; $p = 0.002$). The estimated probability to develop wheezing with all factors present was 99.5%, while 15.7% were observed in the absence of chance factors mentioned. Thus, the FeNO value can be a useful alternative for the diagnosis and screening of children at risk for wheezing.

Keywords: Sensitivity and Specificity. Respiratory Sounds. Nitric Oxide. Child.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATS	<i>American Thoracic Society</i>
DP	Desvio Padrão
EISL	<i>Estudio Internacional de Sibilância em Lactentes</i>
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
FENO	Fração Exalada de Óxido Nítrico
NO	Óxido Nítrico
NOS	Enzima Óxido Nítrico Sintetase
NOS _c	Enzima Óxido Nítrico Sintetase Isoforma Constitutiva
NOS _i	Enzima Óxido Nítrico Sintetase Isoforma Indutiva
OR	<i>Odds Ratio</i>
O ₂	Oxigênio
PPB	Partes por Bilhão
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VEF ₁	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
VEF _{0,5}	Volume Expiratório Forçado no Primeiro 0,5 Segundo
VEF _{0,75}	Volume Expiratório Forçado no Primeiro 0,75 Segundo

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Características dos estudos incluídos	74
Tabela 2. Resultados dos estudos incluídos	75
Tabela 3. Qualidade dos artigos pela ferramenta QUADAS	76

ARTIGO 2

Tabela 1. Caracterização da amostra	91
Tabela 2. Valores diagnósticos da FENO para prever sibilantes não recorrentes e não sibilantes	92
Tabela 3. Valores diagnósticos da FENO para prever sibilantes recorrentes e sibilantes não recorrentes	93

ARTIGO 3

Tabela 1. Distribuição dos casos de sibilância em pré-escolares, odds ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de acordo com variáveis do nível distal.	110
Tabela 2. Distribuição dos casos de sibilância em pré-escolares, odds ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de acordo com variáveis do nível intermediário.	111
Tabela 3. Distribuição dos casos de sibilância em pré-escolares, odds ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de acordo com variáveis do nível proximal.	112
Tabela 4. Modelo final de distribuição dos casos de sibilância em pré-escolares, odds ratio ajustada e respectivos intervalos de confiança de 95% de acordo com as variáveis de nível distal para proximal.	112
Tabela 4. Probabilidades estimadas pelo modelo de regressão hierárquica para desenvolver sibilância em pré-escolares de acordo com fatores de risco.	113

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1. Modelo teórico dos fatores de riscos envolvidos no quadro de sibilância. Círculo: fatores não modificáveis; Quadrado: fatores modificáveis. 24
- Figura 2. Delineamento metodológico do estudo. 42
- Figura 3. Avaliação da FENO pelo equipamento NIOX MINO. 44
- Figura 4. Fluxograma de captação e acompanhamento dos participantes de acordo com o STARD. 47

ARTIGO 1

- Figura 1. Fluxograma do estudo – PRISMA 71
- Figura 2. Análise do risco de viés pela ferramenta QUADAS. Divisão entre os critérios de risco de viés e aplicabilidade em todos os estudos 71
- Figura 3. Análise do risco de viés pela ferramenta QUADAS. Divisão entre os critérios de risco de viés e aplicabilidade para cada estudo analisado 72
- Figura 4. Gráfico de floresta da FENO no diagnóstico de asma não atópica 72
- Figura 5. Gráfico de floresta da FENO no diagnóstico de asma atópica 72
- Figura 6. Gráfico de floresta na comparação de FENO no diagnóstico de asma. Desfecho: Odds-ratio 73
- Figura 7. Gráfico de floresta na comparação de FENO no diagnóstico de asma atópica. Desfecho: Odds-ratio 73

ARTIGO 2

- Figura 1. Fluxograma de acompanhamento do estudo diagnóstico – STARD 94
- Figura 2. Curva ROC para diagnóstico de FENO entre sibilantes e não 94

sibilantes e entre sibilantes recorrentes e sibilantes não recorrentes

Figura 3. Nomograma de probabilidades diagnósticas para sibilância e sibilância recorrente 95

ARTIGO 3

Figura 1. Análise do modelo teórico de fatores de risco para sibilância em crianças pré-escolares. 114

Figura 2. Fluxograma de seleção dos participantes. 115

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Sibilância	18
2.2 Prevalência da Sibilância	18
2.3 Fenótipos de Sibilância	19
2.4 Fatores de Risco Associados à Sibilância	21
2.4.1 <i>Modelo teórico de análise dos fatores de risco</i>	23
2.5 Diagnóstico de Sibilância	24
2.6 Testes de Função Pulmonar em Pré-escolares Sibilantes	25
2.6.1 <i>Espirometria</i>	25
2.6.2 <i>Outros testes de função pulmonar</i>	26
2.7 Óxido Nítrico Exalado	28
2.8 Medida da Fração Exalada de Óxido Nítrico	29
2.8.1 <i>Fatores que alteram a medida da FENO</i>	31
2.9 Utilização Clínica do Óxido Nítrico Exalado	32
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. HIPÓTESES DO ESTUDO.....	35
5. OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivo Geral	36
5.2 Objetivos Específicos	36
5.2.1 <i>Objetivo do Artigo 1</i>	36
5.2.2 <i>Objetivo do Artigo 2</i>	36
5.2.3 <i>Objetivo do Artigo 3</i>	36
6. MÉTODO.....	37
6.1 Método da Revisão Sistemática	37
6.2 Método do estudo de acurácia	39
6.2.1 Desenho do Estudo	39
6.2.2 Local e Período do Estudo	39
6.2.3 Aspectos Éticos	39
6.2.4 População do estudo.....	40
6.2.5 Amostra e Critérios de elegibilidade	40
6.2.6 Amostragem e Cálculo do Tamanho Amostral	40

6.2.7 Procedimentos de Coletas de Dados	41
6.2.8 Instrumentos de Avaliação	43
6.2.8.1 Medidas Antropométricas.....	43
6.2.8.2 Determinação de Sibilância – Padrão-Ouro	43
6.2.8.3 Avaliação da Fração Exalada de Óxido Nítrico	43
6.2.9 Medidas de Desfechos.....	44
6.2.9.1 Desfecho Primário.....	44
6.2.9.2 Desfecho Secundário	45
6.2.10 Operacionalização das Variáveis	45
6.2.10.1 Variável Dependente.....	45
6.2.10.2 Variáveis Independentes Sociodemográficas.....	45
6.2.10.3 Variáveis Independentes Clínicas	45
6.2.11 Fluxograma de Captação e Acompanhamento dos Participantes.....	47
6.2.12 Processamento e Análise dos Dados.....	48
7. RESULTADOS.....	49
7.1 Artigo 1	49
7.2 Artigo 2	49
7.3 Artigo 3.....	49
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICE 1	57
APÊNDICE 2.....	77
APÊNDICE 3.....	96
APÊNDICE 4.....	116
APÊNDICE 5.....	118
ANEXO I.....	121
ANEXO II.....	122
ANEXO III.....	124
ANEXO IV	127

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi realizada em escolas públicas da cidade do Recife, em parceria com o Laboratório de Fisioterapia Cardiopulmonar do Departamento de Fisioterapia da UFPE. Ela foi baseada em pesquisas anteriores que utilizaram o dispositivo portátil de avaliação da fração exalada do óxido nítrico (FENO) – NIOX MINO e teve como objetivo principal avaliar a acurácia desta medida no diagnóstico de sibilância recorrente em crianças pré-escolares, ao estabelecer pontos de corte para diferenciação entre sibilantes e não sibilantes. Os dados obtidos resultaram em três artigos originais intitulados “ACURÁCIA DA FRAÇÃO EXALADA DO ÓXIDO NÍTRICO NO DIAGNÓSTICO DE ASMA INFANTIL: UMA METANÁLISE” que será submetida à *Journal of Pediatrics*, conceito A1 para a área 21 da CAPES, “ÓXIDO NÍTRICO EXALADO COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA PARA SIBILÂNCIA EM CRIANÇAS PRÉ-ESCOLARES” e “FATORES DE RISCO ENVOLVIDOS NO AUMENTO DA PROBABILIDADE PARA SIBILÂNCIA EM PRÉ-ESCOLARES” que serão submetidos à revista *Chest*, conceito A1 para a área 21 da CAPES e à revista *Pediatrics*, conceito A1 para a área 21 da CAPES, respectivamente. A elaboração desta dissertação atendeu às normas vigentes do Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

1. INTRODUÇÃO

A sibilância é um sintoma respiratório manifestado por um som de assobio contínuo que ocorre durante a respiração e sugere estreitamento ou obstrução em alguma parte das vias aéreas respiratórias. Possui impacto significativo entre as crianças, principalmente no primeiro ano de vida, evidenciado pela considerável procura por atendimento médico de urgência nesse período (NETO *et al.*, 2007; DELA BIANCA *et al.*, 2010; MALLOL *et al.*, 2010). Estudos epidemiológicos brasileiros revelaram risco de 52%, na cidade de São Paulo, e 43%, no Recife, para o desenvolvimento do quadro de sibilância nos primeiros anos de vida (DELA BIANCA *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2011).

Várias podem ser as causas de sibilância em lactentes e pré-escolares, as mais frequentes são bronquiolite e asma. No entanto, um estudo de coorte prospectivo realizado com 1246 recém-nascidos em Tucson no Arizona (MARTINEZ *et al.*, 1995), destacou uma proporção significativa de sibilantes não asmáticos relacionados ao histórico de fumo passivo, infecções virais de vias aéreas superiores, tamanho das vias aéreas, anormalidades anatômicas congênitas, aspiração de corpo estranho, outras doenças pulmonares (como fibrose cística), e até doenças gastrointestinais, tornando evidente que o quadro de sibilância nos primeiros anos de vida assume uma natureza heterogênea, diferentemente das crianças maiores onde a asma passa a ser a principal causa (BEVER *et al.*, 2010; BHATT *et al.*, 2011; FITZGERALD *et al.*, 2012; DUCHARME *et al.*, 2014). Investigar pacientes com histórico de sibilância relaciona-se, portanto, à importância do diagnóstico precoce uma vez que estes apresentam risco para o desenvolvimento de asma persistente na adolescência, sobretudo quando atópicos (GARCIA-MARCOS *et al.*, 2010; NETO & ROSÁRIO, 2010).

Na prática clínica, a identificação da sibilância na maior parte dos casos é subjetiva, pois normalmente resulta dos relatos advindos dos pais durante anamnese. No entanto, a mensuração do real acometimento respiratório é importante porque contribui com a interpretação da futura expressão da asma. Isto é, quadros de sibilância recorrente (acima de 3 episódios de sibilância nos últimos seis meses) estão relacionados à um maior comprometimento quando comparados aos quadros de sibilância não recorrente (até 3 episódios de

sibilância nos últimos seis meses) e aos de não sibilância (DELA BIANCA *et al.*, 2010; FRIEDMAN 2010; KONSTANTINOU *et al.*, 2013).

A medida da fração exalada de óxido nítrico (FENO) vem sendo descrita como um método não invasivo e apropriado para detecção de inflamação relacionada à asma nas vias aéreas principalmente em crianças pequenas (LOPES *et al.*, 2005; MANNA *et al.*, 2012). Através de um processo de quimiluminescência, o óxido nítrico (NO) reage com moléculas de ozônio produzindo oxigênio e dióxido de nitrogênio (NO₂). Este, ao regressar ao nível basal de energia, libera uma quantidade de luz correspondente à concentração de NO na amostra sendo assim possível detectar medições tão baixas quanto 1 parte por bilhão (ppb) (ABBA 2009; PEÑA ZARZA *et al.*, 2012). A técnica ideal para mensuração, considerando idade e estado de colaboração, segue as diretrizes publicadas pela *American Thoracic Society (ATS)* e pela *European Respiratory Society (ERS)* em 2005.

Estudos prévios realizados com crianças menores de cinco anos apresentaram uma correlação entre os valores de FENO e o histórico de sibilância, onde foram vistos níveis mais elevados em crianças com forte sibilância ou provável asma (MALMBERG *et al.*, 2003; GABRIELE *et al.*, 2006; MOELLER *et al.*, 2008; PRADO *et al.*, 2011). No entanto, ainda não há estudos que determinem a acurácia diagnóstica desta medida, sobretudo em pré-escolares. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia da FENO no diagnóstico de sibilância e identificar de pontos de corte desta medida que diferenciem crianças pré-escolares sibilantes de não sibilantes, e sibilantes recorrentes de não recorrentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A síntese temática e os enfoques acerca desta dissertação estão descritas a seguir através de uma revisão de literatura.

2.1 Sibilância

O sibilo, também conhecido como chiado, pode ser definido como som agudo e contínuo emitido durante a expiração resultante do estreitamento das vias aéreas e limitação do fluxo expiratório (TENERO *et al.*, 2013). É um dos sintomas respiratórios mais comuns durante a infância, relacionado ou não às doenças respiratórias, que tende a decrescer com o avançar da idade. A sibilância é um quadro que, frequentemente, vem acompanhado por outros sintomas além do sibilo como tosse, falta de ar (com ou sem esforço) e aperto no peito (DELA BIANCA *et al.*, 2010).

As duas razões mais frequentes de sibilância em crianças são a bronquiolite e a asma. Causas menos comuns incluem anormalidades anatômicas congênitas, aspiração de corpo estranho, distúrbios imunitários, distúrbios gastrointestinais, distúrbios cardíacos e outros distúrbios pulmonares como a fibrose cística, por exemplo. O vírus sincicial respiratório é o principal agente responsável pelo desenvolvimento da bronquiolite em lactentes. A infecção dos bronquíolos gera edema, broncoespasmo e necrose das vias aéreas, contribuindo para a obstrução (DUCHARME *et al.*, 2014).

Independente da causa, a sibilância exerce impacto na qualidade de vida e demanda elevada procura por atendimento médico de urgência, principalmente quando os episódios tornam-se recorrentes. Crianças sibilantes necessitam de atenção e tratamento adequado com intuito de prevenir evolução desfavorável e morbidade acentuada (DELA BIANCA *et al.*, 2010).

2.2 Prevalência da sibilância

A sibilância é uma condição comum em emergências pediátricas, estudos estimam que pelo menos uma em cada três crianças apresenta episódio de sibilância do nascimento a idade pré-escolar (TENERO *et al.*, 2013; DUCHARME *et al.*, 2014). Estudo pioneiro realizado em Tucson, Estados Unidos, informou por meio de uma coorte de 1246 recém-nascidos que

aproximadamente 34% das crianças por ele avaliadas apresentaram pelo menos um episódio de sibilância associado à infecção de vias aéreas até os três anos de vida (MARTINEZ *et al.*, 2002). Uma frequência de 28,5% de sibilância no primeiro ano de vida, de foi obtida na Holanda em um estudo transversal de base populacional, realizado através de informações de 1.115 questionários respondidos pelos pais de crianças com 13 meses de idade (VISSER *et al.*, 2010).

No Brasil, um estudo transversal realizado por Neto *et al.* (2007) no estado do Paraná, segundo o protocolo do *Estudio Internacional de Sibilancia em Lactantes* (EISL) onde pais e/ou responsáveis de 1.364 crianças de 12 a 15 meses de idade responderam ao questionário escrito padronizado (QE-EISL), evidenciou a prevalência de sibilância no primeiro ano de vida, de 45,4%. Em Pernambuco, o mesmo desenho e protocolo de estudo foi utilizado por Medeiros *et al.* (2011), e foi observado, através de informações de 1.071 questionários, uma prevalência semelhante de 43% de sibilância no primeiro ano de vida. Na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, uma coorte de nove anos avaliou 897 crianças na idade de dez a doze anos, e constatou prevalência de 43,9% de sibilância até os quatro anos de idade (MUIÑO *et al.*, 2008).

Os casos mais graves de sibilância, caracterizados por maior frequência de episódios, apresentou menor prevalência em todos os estudos citados. Esta informação reflete o perfil da sintomatologia que tende a persistir apenas em pequena parcela da população acometida, pois em muitos casos o desenvolvimento e a maturação do sistema respiratório são suficientes para cessação dos episódios (LIMA *et al.*, 2010; SONNAPA *et al.*, 2010).

2.3 Fenótipos de sibilância

A caracterização da sibilância em pré-escolares pode ser considerada mais difícil quando comparada com as crianças em idade escolar, uma vez que estas apresentam condições clínicas marcantes e de fácil diagnóstico como a obstrução brônquica reversível e a hiperreatividade brônquica identificadas pela espirometria. Portanto, estudos de coorte vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar os diferentes fenótipos da sibilância em crianças pré-escolares. Apesar da diversidade de nomenclaturas encontradas na literatura,

todas são fundamentadas de acordo com a frequência e a evolução dos episódios, assim como o período de surgimento deles (SOLÉ, 2008; TENERO *et al.*, 2013).

Uma das primeiras classificações propostas por Martinez *et al.* (2002), considerou a associação entre a idade de surgimento da sibilância e suas características aos seis anos, determinantes para o surgimento de três principais fenótipos: sibilantes transitórios, persistentes de início precoce, e persistentes de início tardio. Desde então, diversos estudos replicaram esses fenótipos, alguns com ligeiras variações no tempo de aparecimento do chiado, mas todos baseados na trajetória longitudinal de sibilos.

Recentemente uma coorte realizada na Austrália com 620 crianças acompanhadas entre 4 semanas e 7 anos de idade, definiu cinco fenótipos com base no padrão da sibilância: nunca sibilantes, sibilantes transitórios precoces, sibilantes persistentes precoces, sibilantes de início intermediário, e sibilantes de início tardio. Para tais classificações os autores consideraram como surgimento precoce quando ocorreu nos primeiros 6 meses de vida, surgimento intermediário quando ocorreu por volta dos 18 meses de vida e surgimento tardio após os 4 anos de idade. Os ditos transitórios foram as crianças que apresentaram cessação dos sintomas aos 3 anos de idade, enquanto os persistentes aquelas que mantiveram o quadro de sibilância após essa idade (LODGE *et al.*, 2014).

Outra coorte de três anos desenvolvida na Espanha, com 3.739 crianças, registrou sibilância em 45,6% de sua amostra. Esse total foi classificado em quatro diferentes classes fenotípicas: (I) nunca sibilante – classe correspondente às crianças que nunca apresentaram episódio de sibilância, (II) sibilante transitório – classe correspondente às crianças que apresentaram queda na incidência da sibilância, (III) sibilante persistente – classe correspondente às crianças com elevada incidência de episódios, (IV) sibilante tardio – classe com baixa incidência correspondente às crianças que apresentaram o primeiro episódio a partir dos 19 meses (CANO-GARCINUÑO *et al.*, 2014).

Em 2008, a Academia Europeia e Academia Americana de Asma, Alergia e Imunologia publicaram consenso sobre sibilância em lactentes (PRACTALL), onde quadro padrões distintos de sibilância foram classificados de acordo com

as manifestações atópicas: (I) sibilância transitória – sibilos até os três primeiros anos de vida, (II) sibilância não atópica – desencadeada por vírus que tende a desaparecer com a idade, (III) asma persistente – sibilância associada a manifestações atópicas comprovadas, e (IV) sibilância intermitente grave – episódios pouco frequentes associados à presença de características atópicas (BACHARIER *et al.*, 2008).

Uma revisão sistemática sobre sibilância em crianças pré-escolares contribuiu com a síntese dos termos utilizados para classificação da sibilância em geral, onde foram consideradas tanto as manifestações atópicas quanto o surgimento e a evolução dos episódios. Dessa forma, os fenótipos descritos foram: (a) nunca sibilantes, (b) sibilância transitória precoce – inicia antes dos 3 anos e resolve-se na idade escolar, (c) sibilância tardia – inicia a partir dos 4 anos de idade, (d) sibilância persistente, (e) sibilância não atópica, (f) sibilância atópica / asma (TENERO *et al.*, 2013).

Em resumo, as evidências apontam que o lactente e o pré-escolar sibilantes possuem diversos fenótipos e ainda não há uniformidade sobre estes, pois as classificações propostas até o momento são baseadas em diferentes referências adotadas pelos autores em cada estudo. Apesar destas divergências, a identificação dos fenótipos de sibilância e o reconhecimento dos fatores de risco associados a cada um deles é importante, uma vez que estes podem contribuir na previsão dos desfechos da doença em longo prazo (TENERO *et al.*, 2013; DUCHARME *et al.*, 2014).

2.4 Fatores de risco associados à sibilância

Os mecanismos que envolvem o desenvolvimento da sibilância ainda não estão bem esclarecidos na literatura, os estudos mostram que a interação entre fatores biológicos, hereditários, demográficos, nutricionais, ambientais, socioeconômicos e de antecedentes mórbidos são determinantes para expressão da sibilância, e quanto maior o número de fatores envolvidos nessa interação, maior a gravidade do quadro na infância (DELA BIANCA *et al.*, 2010; CAUDRI *et al.*, 2013; DUCHARME *et al.*, 201).

Quanto ao fator biológico, estudo em genética tem identificado variantes comuns associadas com a asma, o lócus 17q21 contendo os genes ORMDL3 e GSDMB, por exemplo, é o fator de risco mais consistentemente replicado para

asma na infância. Embora a identificação deste fator genético forneça uma nova visão sobre a patogênese da asma, sabe-se que a interação gene-ambiente possui papel igualmente importante, sobretudo para o surgimento da atopia, que se trata da predisposição em produzir anticorpos da classe IgE contra alérgenos ambientais, geralmente proteínas (DUCHARME *et al.*, 2014).

Quanto à hereditariedade, alguns estudos mostram que mulheres com asma grave não controlada durante a gravidez são 27% mais susceptíveis em dar à luz uma criança com diagnóstico de asma antes dos 12 anos de idade, e essa chance ainda aumenta se apresentarem índice de massa corpóreo elevado (CAUDRI *et al.*, 2013; DUCHARME *et al.*, 2014).

Sobre o fator de risco demográfico para desenvolvimento da sibilância, os estudos relatam que crianças menores são mais susceptíveis que as maiores, da mesma forma que o sexo masculino em relação ao feminino, devido ao reduzido tamanho das vias aéreas em relação aos pulmões de meninos e meninas comparados na mesma idade (DELA BIANCA *et al.*, 2010; CAUDRI *et al.*, 2013). No entanto, ainda há controvérsias na literatura quanto a esse achado. No estudo de Medeiros *et al.* (2011), por exemplo, observou-se que o gênero feminino foi o mais acometido quanto ao número de episódios de chiado, hospitalizações por bronquite ou pneumonia, diagnóstico médico de asma, tabagismo passivo e uso de corticosteroide oral. Especulações foram feitas para justificar tal achado, como o maior tempo de amamentação apresentado pelas meninas e o predomínio do sexo na população estudada.

A prematuridade é comumente descrita na literatura como fator diretamente associado ao desenvolvimento de sibilância intermitente precoce (CAUDRI *et al.*, 2013). Uma metanálise sobre nascimento pretermo e sibilância na infância concluiu que filhos nascidos prematuros apresentam risco três vezes maior de desenvolverem distúrbios de sibilância durante a infância (OR= 3,00 / 95% CI 2,61-3,44). Isto é justificado pelo fato de que o parto prematuro frequentemente é acompanhado por outros fatores tais como distúrbios metabólicos, hipoxia, infecções respiratórias, sepse, ventilação mecânica, hiperoxia e baixo peso. Todos somados provocam efeitos adversos sobre a maturação pulmonar, estrutura e desenvolvimento celular, assim como reatividade das vias aéreas (BEEN *et al.*, 2014).

Ainda quanto ao aspecto nutritivo, outro fator relevante e bastante documentado na literatura, principalmente quanto ao aspecto preventivo da sibilância, é o aleitamento materno. Bener *et al.* (2007), concluíram em seu estudo que a amamentação exclusiva impede o desenvolvimento de doenças alérgicas em crianças, posteriormente, esses achados também foram confirmados por Guibas *et al.* (2013), que apontaram o aleitamento materno como vantajoso na redução infecciosa e doenças imunológicas.

Fatores ambientais e socioeconômicos estão comumente interligados. Estudos apontam o baixo nível socioeconômico determinante para algumas exposições ambientais. O tabagismo materno durante a gestação, por exemplo, é descrito como um agressivo fator de risco para sibilância. Ele altera o desenvolvimento pulmonar fetal, reduz a função pulmonar e relaciona-se diretamente ao desenvolvimento de taquipneia transitória do recém-nascido, baixo peso ao nascimento, prematuridade, sibilância de repetição no primeiro ano de vida e aumenta significativamente o risco de asma durante a infância. No período pós-natal os efeitos do fumo decorrem basicamente da irritação no trato aéreo que determina distúrbios imunológicos, seja na produção de citocinas, na função das células mononucleares e na imunidade inata (FRÍGULS *et al.*, 2009; DUIJTS *et al.*, 2012; CAUDRI *et al.*, 2013).

Por fim, antecedentes mórbidos da criança, como as infecções de vias aéreas superiores no primeiro trimestre de vida também são descritas como um dos principais desencadeantes de sibilância. O *vírus sincicial respiratório* é o responsável pela maior parte dos casos de infecções e desenvolvimento de bronquiolite em lactentes, mas outros, como o *rinovírus humanos*, também podem indicar um risco equivalente, contudo, este parece estar mais bem estabelecido como fator de risco para o desenvolvimento subsequente de asma. Durante a infecção viral pode haver lesão do epitélio das vias aéreas com posterior inflamação desencadeando reação imunológica e hiperresponsividade brônquica (BEEN *et al.*, 2014).

2.4.1 Modelo teórico de análise dos fatores de risco para sibilância em pré-escolares:

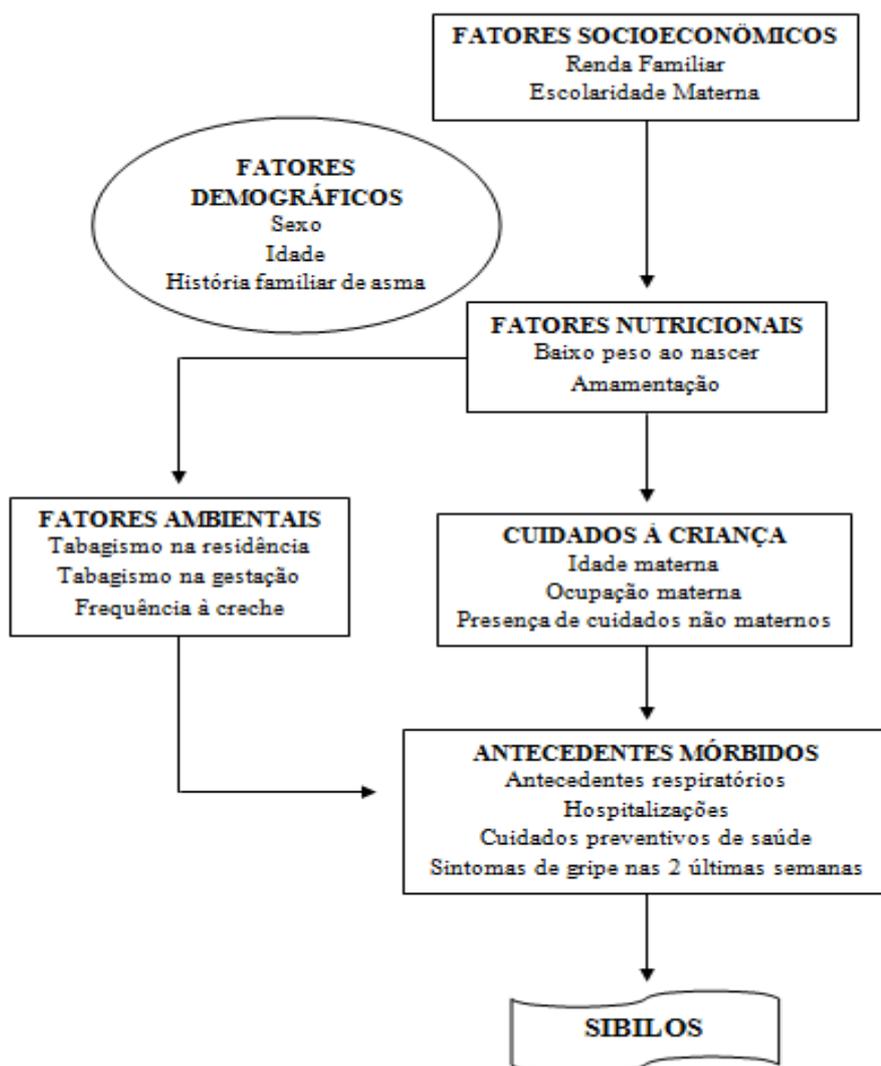


Figura 1: Modelo teórico dos fatores de riscos envolvidos no quadro de sibilância. Círculo: fatores não modificáveis; Quadrado: fatores modificáveis.

2.5 Diagnóstico de sibilância

O sibilo é um sintoma nem sempre fácil de ser reconhecido principalmente quando a criança é mais jovem. Estudos mostram que frequentemente os pais rotulam erroneamente qualquer respiração ruidosa (obstrução de vias aéreas superiores, secreção) como sibilo. Esses achados refletem o grau de imprecisão envolvido no uso do termo sibilo na prática clínica que podem levar a uma superestimação no diagnóstico e implicações importantes quanto ao acompanhamento do tratamento de crianças ditas sibilantes (CANE *et al.*, 2000; WRIGHT *et al.*, 2002; SAGLANI *et al.*, 2005; BHATT & SMYTH, 2011). Portanto, detalhar a história da criança focando na identificação de todos os possíveis fatores de risco, assim como na exclusão de condições

confundidoras, pode fornecer pistas valiosas que permitam a complementação para o diagnóstico (BACHARIER *et al.*, 2011; BHATT & SMYTH, 2011).

Dada a variedade de agentes causais e do pleomorfismo das manifestações clínicas, os exames complementares são necessários na maioria dos casos. Os testes mais utilizados são: testes cutâneos para aeroalérgenos, dosagem de cloretos do suor, pesquisa de imunodeficiências, radiografia e tomografia computadorizada de tórax, estudos para pesquisa de refluxo gastroesofágico, dentre outros. Outros exames como: oscilometria de impulso, espirometria e broncoscopia, com ou sem biópsia endobrônquica e biópsia pulmonar, também podem ser utilizados. Entretanto, para reprodutibilidade na prática clínica, mais estudo são necessários objetivando estimar os valores de referência em pré-escolares saudáveis e sibilantes (BEVER *et al.*, 2010; BACHARIER *et al.*, 2011).

Uma força-tarefa da *European Respiratory Society* (ERS) recomendou a seguinte abordagem para avaliação da sibilância em pré-escolares (BRAND *et al.*, 2008):

1. Avaliação por anamnese do padrão e desencadeantes da sibilância, antecedentes pessoais e familiares de alergia e tabagismo doméstico.
2. Testes de alergia devem ser realizados em crianças que necessitam de acompanhamento em longo prazo.
3. Outros exames devem ser evitados, a menos que a sibilância persista de forma grave, resistente à terapêutica ou acompanhada por características clínicas incomuns.

2.6 Testes de função pulmonar em pré-escolares sibilantes

Os testes de função pulmonar desempenham um papel importante no diagnóstico, na resposta aos tratamentos, e no acompanhamento da severidade das doenças pulmonares crônicas. Em crianças com menos de seis anos, eles apresentam papel limitado devido os desafios da medição da função pulmonar nesses pacientes jovens, e, portanto, devem sempre ser interpretados dentro do contexto de outros sinais e sintomas clínicos (ROSENFELD *et al.*, 2013).

2.6.1 Espirometria

A espirometria é amplamente utilizada para avaliar função pulmonar em crianças mais velhas e em adultos. Em pré-escolares com sibilância, ela pode ser realizada para estabelecer valores de função pulmonar basal assim como alterações pulmonares. No entanto, estudos mostram que curvas expiratórias completas são de difícil obtenção nessa população e que a maioria dos pré-escolares apresenta valores previstos do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) dentro da normalidade, sem resposta substancial ($VEF_1 > 12\%$) à administração de um broncodilatador β_2 -adrenérgico de curta duração, portanto valores de volume expiratório forçado no primeiro 0,5 segundo ($VEF_{0,5}$) e 0,75 segundo ($VEF_{0,75}$) são mais frequentemente descritos (BACHARIER *et al.*, 2011; BORREGO *et al.*, 2012; BURITY *et al.*, 2013; ROSENFELD *et al.*, 2013).

2.6.2 Outros testes de função pulmonar

Além da espirometria, outros testes de função pulmonar são descritos para avaliação de pré-escolares, como a resistência específica das vias aéreas (sRaw). Neste exame, a resistência das vias aéreas é calculada a partir da relação entre medições simultâneas do fluxo de abertura das vias aéreas e da pressão medida pela pletismografia de corpo inteiro. A criança posiciona-se sentada respirando livremente por uma máscara ou bocal, sem qualquer manobra especial de respiração (ROSENFELD *et al.*, 2013). Um estudo desenvolvido por Lowe *et al.* (2005) pôde constatar, pelo aumento nos valores de sRaw, que crianças sibilantes aos 3 anos de idade apresentam risco acentuadamente maior de desenvolverem sibilância persistente aos 5 anos (OR=5,2). No entanto, Harrison *et al.* (2010) em outro estudo, observou que a função pulmonar em pré-escolares com histórico de sibilância medida pela sRaw não se mostrou diferente das crianças saudáveis, o que sugere questionamento quanto à verdadeira capacidade discriminatória deste teste nos casos de sibilância.

Da mesma forma que a sRaw, a técnica de resistência do interruptor (Rint) mede a resistência das vias aéreas durante a ventilação espontânea com base no pressuposto de que a pressão na boca e a pressão nos alvéolos atinjam um equilíbrio instantâneo após uma breve interrupção do fluxo aéreo expiratório. Nenhuma manobra forçada é necessária. A facilidade de uso da técnica, a portabilidade do equipamento e a possibilidade de correlação entre

Rint e os valores espirométricos têm aumentado o interesse pelo método e seu uso em crianças, especialmente as menores (BEYDON *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2012).

No entanto, devido à grande variabilidade encontrada nos valores basais de Rint, este teste ainda não discrimina bem as crianças saudáveis daquelas com sibilância recorrente. Estudos mostram que 5-40% dos pré-escolares sibilantes podem apresentar valores basais de Rint anormais quando estáveis clinicamente. Quanto à precisão em detectar resposta ao broncodilatador entre pré-escolares com sibilância e saudáveis, os estudos concebidos até o momento relataram especificidade entre 70 e 92%, e sensibilidade entre 24 e 76%, concluindo que a interpretação do diagnóstico não deve ser baseada apenas nos valores de Rint (BEYDON *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2012; ROSENFELD *et al.*, 2013).

Outra possibilidade também utilizada para medida da função pulmonar é a Técnica de Oscilações Forçadas (TOF). Ela fornece uma análise detalhada da mecânica e resistência do sistema respiratório, parâmetros estes não disponíveis pela espirometria. Para executar a TOF, a criança deve respirar tranquilamente por um bocal onde oscilações de pressão são transmitidas às vias aéreas e a resposta a esse sinal é traduzida em impedância do sistema respiratório, resistência do sistema respiratório, e reatância do sistema respiratório, esta determinada principalmente pela elastância pulmonar (BEYDON *et al.*, 2007; HARRISON *et al.*, 2010).

Entre os estudos recentes que utilizaram a TOF em crianças com asma ou sibilos recorrentes, alguns relataram resistência significativamente mais alta e reatância mais baixa do que em indivíduos saudáveis (OOSTVEEN *et al.*, 2010; DEBLEY *et al.*, 2011), enquanto outros relataram função pulmonar semelhante em ambos os grupos (THAMRIN *et al.*, 2007; HARRISON *et al.*, 2010). Também não há consenso entre os resultados encontrados quanto à avaliação da resposta ao broncodilatador, portanto mais estudos ainda são necessários (ROSENFELD *et al.*, 2013).

Por fim, o *Multiple-Breath Inert Gas Washout Technique* (técnica MBW) avalia a distribuição de uma mistura de gases no pulmão e fornece uma medida indireta de capacidade residual funcional (CFR), além do índice de depuração pulmonar, um marcador sensível de obstrução de vias aéreas. Para

executar a técnica, o pré-escolar é instruído a apenas respirar um gás inerte (gás marcador, pode ser hélio, argônio, ou hexafluoreto de enxofre) através de uma máscara facial ou bocal modificado (BEYDON *et al.*, 2007; ROSENFELD *et al.*, 2012). Apesar da praticidade da técnica, sua execução pode exigir equipamentos caros, tais como espectrômetro de massa, o que limita a realização na prática clínica. Há, também, reduzido número de estudos comparativos que avaliam a utilização de diferentes gases marcadores, equipamentos e procedimentos, sobretudo com crianças sibilantes (BEYDON *et al.*, 2007; ROSENFELD *et al.*, 2013).

2.7 Óxido nítrico exalado

Os testes de função pulmonar são frequentemente utilizados para avaliação e monitoração de pacientes com doenças pulmonares, entretanto, a determinação dos marcadores de inflamação das vias aéreas é mais difícil, e pode necessitar de exames invasivos como a broncoscopia. Diante de tal contexto, os níveis de óxido nítrico exalado vêm sendo sugeridos como uma alternativa à avaliação não invasiva de inflamação em vias aéreas (MANNA *et al.*, 2012).

O óxido nítrico (NO) é um mediador biológico do nosso organismo que atua como mensageiro no processo de vasodilatação, em reações imunológicas e de neurotransmissão. Ele é sintetizado pela enzima NO sintetase (NOS) que catalisa a oxidação de L-arginina em NO e L-citrulina. A NOS pode existir na isoforma constitutiva (NOS_c), a qual é ativada pelo aumento de cálcio intracelular, produzindo pequenas quantidades de NO. Estas desempenham efeitos locais como a regulação da vasodilatação das células endoteliais vasculares e neurotransmissão de neurônios periféricos (ABBA, 2009).

A NOS também pode existir na isoforma indutiva (NOS_i), esta é ativada por estímulos inflamatórios e infecciosos (citocinas pró-inflamatórias ou lipopolissacarídeo bacteriano), produzindo grandes quantidades de NO, independentes do cálcio. A NOS_i é expressa por células endoteliais, células do músculo liso, macrófagos, eosinófilos, linfócitos T e células epiteliais brônquicas, sendo estas a origem da maior parte do NO exalado (LOPES *et al.*, 2005; MANNA *et al.*, 2012).

O NO foi descrito pela primeira vez como um relaxante do músculo liso vascular e foi, subsequentemente, encontrado no ar expirado de animais e humanos. Ele atua como um neurotransmissor que desempenha ação relaxante sobre o músculo liso das vias aéreas, via nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos (sistema NANC), determinando broncodilatação hiperemia, edema e exsudação em oposição aos estímulos colinérgicos broncoconstrictores. Restam dúvidas, portanto, se o aumento da produção de NO nos casos de asma, por exemplo, é primariamente benéfico (protetor) por sua ação broncodilatadora, ou se ele exacerba o quadro asmático pela perpetuação e amplificação do processo inflamatório (ação pró-inflamatória tóxica), devido o aumento do extravasamento de plasma das vênulas pós-capilares e consequente aumento da resistência das vias aéreas pela exsudação (ABBA, 2009; MANNA *et al.*, 2012; FERRANTE *et al.*, 2013; PRICE *et al.*, 2013).

O NO na fase gasosa é bastante estável difundindo-se rapidamente para as células vizinhas. Se for formado em tecidos e órgãos em que ocorra difusão para um lúmen, torna-se possível detectá-lo em amostras gasosas colhidas desse órgão, o que ocorre, por exemplo, nas vias aéreas. Os níveis de NO do trato respiratório superior são maiores do que nas vias aéreas inferiores, com a concentração máxima nos seios paranasais, provavelmente por causa do aumento da atividade da NOS no local e da reduzida ventilação (LOPES *et al.*, 2005).

Durante os últimos anos, a disponibilidade dos analisadores de NO e a publicação de diretrizes oficiais sobre a medição da fração exalada do óxido nítrico (FENO) permitiram que este se tornasse uma ferramenta útil no diagnóstico de diversas doenças das vias aéreas, sobretudo em pacientes pediátricos (FERRANTE *et al.*, 2013; PRICE *et al.*, 2013).

2.8 Medida da fração exalada de óxido nítrico

A medida da FENO é feita por um processo de quimiluminescência, onde o NO da amostra do gás reage com moléculas de ozônio produzindo oxigênio e dióxido de nitrogênio que, ao regressar ao nível basal de energia, libera um fóton com a quantidade de luz correspondente à concentração de NO da

amostra. Este é um processo tão sensível que permite detectar medições muito baixas como 1 parte por bilhão (ppb) (PISI, 2010).

De acordo com as recomendações de procedimento padrão descritas pela ATS/ERS (2005), a FENO pode ser medida de forma *online* ou *offline*. A medição *online* refere-se a testes com visualização dos valores de FENO em tempo real, enquanto que a medição *offline* refere-se à coleta do gás expirado em reservatório adequado para posterior análise da concentração de NO. Este método, entretanto, apresenta desvantagens tais como: contaminação com gás não proveniente das vias aéreas inferiores, deterioração da amostra durante o transporte e armazenamento e dificuldade na padronização dos procedimentos (PISI, 2010).

A técnica de *single-breath online* (SBOL) é a utilizada, preferencialmente, para crianças de 2 a 5 anos. Durante o procedimento a criança deve estar sentada confortavelmente, sem clip nasal, enquanto orienta-se a inspiração do ar livre de NO (por filtragem – *NO scrubber*), através de uma peça bucal descartável, até próxima a capacidade pulmonar total, seguida de exalação constante por 6 a 10 segundos mantendo taxa de fluxo de 50ml/s. A resistência oferecida pela cavidade oral entre 10 a 20 cmH₂O, permite que o palato mole oclua a nasofaringe evitando contaminação da amostra com o ar das vias superiores (maior concentração de NO). O uso de feedback visual facilita o alcance da taxa de fluxo ideal. Se a criança não atinge esse fluxo, a medida não é registrada (ATS/ERS, 2005; PISI, 2010).

Um estudo realizado por Koopman *et al.* (2009) investigou a concordância entre as medidas de FENO com tempos de expiração de 6 (FENO-6) e de 10 segundos (FENO-10) entre crianças. Foi visto que FENO-6 e FENO-10 apresentam excelente concordância e que ambos os métodos podem ser utilizados alternadamente sem prejuízo quanto aos valores encontrados. Esse achado é importante, pois pré-escolares com capacidades vitais abaixo de 3L preferem tempos mais curtos para realização da técnica.

Outra informação relevante fornecida por Menzies *et al.* (2007) refere-se à comparação das medidas da FENO entre o analisador portátil de NO (NIOX MINO, Aerocrine, Suécia) e o analisador de laboratório dito padrão-ouro (NIOX, Aerocrine). Um total de 101 pacientes asmáticos e 50 voluntários saudáveis foram avaliados simultaneamente quanto à FENO nos diferentes dispositivos.

Foi observada uma boa correlação entre as medidas obtidas utilizando cada dispositivo ($r = 0,94$ e $0,96$, respectivamente). Portanto, os valores de FENO obtidos através de um analisador portátil correlacionam-se bem com os resultados obtidos utilizando um analisador de laboratório, podendo ser utilizado para discriminar pacientes asmáticos de não asmáticos.

No entanto, os dispositivos portáteis apresentam maior custo e não podem ser calibrados manualmente. O processo de calibração é automático e necessita de condições ambientais estáveis, tais como temperatura, pressão e umidade. Mudança nessas variáveis implica em recalibração do equipamento, o que pode ser um fator limitante durante o processo de medição da FENO. Recomenda-se que os processos de calibração e aferição aconteçam em ambiente, preferencialmente, úmido e frio (entre 18°C e 22°C) garantindo funcionamento adequado do equipamento portátil (ATS/ERS, 2005).

Entre as principais vantagens na escolha da medida da FENO em relação a outras técnicas de função pulmonar, principalmente em pré-escolares, estão a simplicidade, a rapidez, e a reprodutibilidade da técnica. Além disso, o valor de FENO não apresenta alteração com a aprendizagem (efeito aprendizagem encontrado na espirometria), pois o processo automático de aferição elimina as manobras incorretas e reduz a necessidade de treinamento profissional (ATS/ERS, 2005; MENZIES *et al.*, 2007; PISI, 2010).

2.8.1 Fatores que alteram a medida da FENO em pré-escolares:

- Idade: Existe correlação positiva entre idade e valores de FENO em crianças, reflexo do aumento da área de superfície das vias aéreas com a idade;
- Sexo: Os achados em crianças revelam que existe chance maior (OR=1,26) dos meninos apresentarem valores mais elevados que as meninas;
- Fator antropométrico: Existe correlação positiva entre dados antropométricos e FENO, provavelmente porque crianças maiores apresentam maior área de superfície mucosa de vias aéreas que produzem NO.
- Medicação: Broncodilatadores como β -agonistas, têm mostrado aumentar os valores de FENO enquanto os broncoconstrictores levam a

redução. Possivelmente a mudança no calibre das vias aéreas altera o mecanismo de produção do NO;

- Ritmo circadiano e variação sazonal: Não há consenso se o ritmo circadiano e a variação sazonal influenciam os valores de FENO, portanto é prudente que, se possível, todas as medições aconteçam no mesmo período do dia;
- Espirometria: Na prática recomenda-se que a espirometria seja realizada depois da medição da FENO, pois manobras respiratórias forçadas podem causar diminuição significativa dos seus valores, efeito este que pode durar até 1 hora (ABBA, 2009; MOTOMURA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013).

2.9 Utilização clínica do óxido nítrico exalado

Muitos são os estudos que direcionam seus objetivos para o valor diagnóstico da FENO, sobretudo em crianças pré-escolares. Inicialmente, Malmberg *et al.* (2003), através de um estudo transversal com 158 crianças entre 3,8-7,5 anos, descreveram que crianças com provável asma, caracterizadas por apresentar sibilância recorrente recente, apresentavam valor significativamente maior de FENO, com diferença média de 16,8 ppb (IC 95% 12,0-21,5) em comparação aos controles. Estes achados foram confirmados posteriormente por Brussee *et al.* (2005), através de uma coorte com 429 crianças. Foi observado que crianças asmáticas e atópicas aos 4 anos apresentaram média de FENO maior que as saudáveis (10 ppb e 7,9 ppb, respectivamente). Em 2006, Gabriele *et al.* em um estudo transversal, avaliaram 228 bebês entre 4,6 e 25,2 meses de idade, através do método offline de aferição, e relataram valores maiores de FENO nos lactentes sibilantes, especialmente os atópicos (FENO= 18,6; IC 95%: 15,6-22,2) quando comparados aos saudáveis (FENO= 10,4; IC 95%: 9,1-12,0).

Subsequentemente, Moeller *et al.* (2008) em um estudo transversal com 391 crianças menores de 4 anos, se propuseram a investigar se a medida da FENO poderia ser útil para distinguir subgrupos de sibilantes e não sibilantes. Foi observado que as crianças sibilantes recorrente apresentaram maior mediana (intervalo interquartil) dos níveis de FENO (11,7 [11,85]) quando comparadas às crianças não sibilantes (6,5 [5,5]; P <0,001). Em concordância

com Gabriele *et al.* e Moeller *et al.*, uma coorte de 4 meses realizada em crianças entre 2 meses e 2 anos de idade, observou boa concordância entre maiores valores de FENO e índice preditivo de asma positivo, com Kappa de Cohen = 0,71 (PRADO *et al.*, 2011).

Em 2013, um grupo de pesquisadores investigou se havia diferença entre os valores de FENO, função pulmonar e atopia entre 372 pré-escolares de 4 a 6 anos, de acordo com o seu fenótipo de sibilância. Os resultados mostraram que sibilantes persistentes e sibilantes de início tardio tiveram concentração de FENO significativamente mais elevada do que sibilantes transitórios e sibilantes de início precoce. Em contraste, não houve diferença na função pulmonar ou presença de atopia de acordo com fenótipo de sibilância, concluíram, portanto, que a FENO pode ser um melhor marcador de fenótipos de asma em crianças pré-escolares do que os resultados dos testes de função pulmonar (OH *et al.*, 2013). Objetivando maior investigação quanto o comportamento de crianças sibilantes no decorrer da infância, Singer *et al.* (2013) realizaram uma coorte com 166 crianças entre 3-47 meses até os 6 anos de idade e puderam concluir que a FENO elevada foi associada com o aumento do risco de asma em idade escolar, com probabilidade de 58%.

Todos os estudos mencionados retratam a capacidade promissora da FENO como marcador diagnóstico. No entanto, nenhum destes estudos se concentrou na investigação da acurácia da FENO e consequente determinação de um ponto de corte ideal que diferencie os fenótipos de sibilância entre pré-escolares. Ainda não há um valor estabelecido na literatura que possa ser utilizado como referência para categorizar pré-escolares quanto o tipo de sibilância na prática clínica.

3. JUSTIFICATIVA

Como documentado em estudos anteriores, a medida da FENO é reconhecida como uma ferramenta potencial para auxiliar no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com suspeita de asma, ditos sibilantes. Os níveis elevados de FENO nesses pacientes demonstram uma relação direta entre a doença e sua gravidade, e, sobretudo, subsequente deterioração da função pulmonar. No entanto, não há estudos que validem a função diagnóstica desta medida apresentando valores de corte para diferenciar pré-escolares saudáveis e sibilantes, assim como sibilantes recorrentes e não recorrentes.

Tais perspectivas expressam a contribuição científica que esse estudo pode fornecer uma vez que, de forma inédita, permitirá gerar valores acerca do diagnóstico de sibilância pela medida da FENO numa população alvo para distúrbios respiratórios, em um tempo de pesquisa factível com o protocolo desenvolvido. No contexto da aplicabilidade clínica, a possibilidade de abordagem precoce de crianças sibilantes permitirá intervenção multiprofissional adequada, de acordo com a gravidade dos casos, assim como adequação da titulação medicamentosa.

4. HIPÓTESES DO ESTUDO

O presente estudo teve como hipóteses:

- Em pré-escolares, a fração exalada de óxido nítrico (FENO) é maior nos sibilantes recorrentes quando comparados aos sibilantes não recorrentes e estes, por sua vez, apresentam FENO maior que os não sibilantes.
- A medida da FENO é acurada para diferenciar pré-escolares sibilantes de não sibilantes e sibilantes recorrentes de não recorrentes.
- A interação dos fatores de risco é determinante para caracterização do quadro de sibilância.

5. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

5.1 Objetivo Geral

Determinar a acurácia diagnóstica da FENO na discriminação de pré-escolares quanto a presença e recorrência de sibilância.

5.2 Objetivos Específicos

O objetivo geral foi subdividido em objetivos específicos e analisado sob a forma de três artigos originais:

- **Objetivo do artigo 1:**

Avaliar através da melhor evidência disponível a acurácia da FENO no diagnóstico de asma em crianças e adolescentes comparado à espirometria (APÊNDICE 1).

- **Objetivo do artigo 2:**

Determinar o ponto de corte, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, curva ROC e Razão de Verossimilhança da FENO ao diagnóstico de sibilância em pré-escolares comparado ao questionário de doenças respiratórias ATS – DLD –78-C (APÊNDICE 2).

- **Objetivo do artigo 3:**

Avaliar a influência dos valores elevados de FENO em um modelo de fatores de risco para sibilância em crianças pré-escolares (APÊNDICE 3).

6. MÉTODO

Esta dissertação foi dividida em 2 tipos de estudos: (I) Estudo de revisão sistemática e (II) Estudo de acurácia diagnóstica, com as seguintes características metodológicas:

6.1 MÉTODO DA REVISÃO SISTEMÁTICA

6.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos estudos do tipo transversal e coorte que realizassem análise de acurácia diagnóstica, com crianças entre 5-18 anos, atópicas ou não atópicas, que apresentassem confirmação ou exclusão do diagnóstico de asma pela espirometria e pela FENO.

6.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos artigos com animais; artigos com indivíduos adultos; indivíduos com comorbidades respiratórias associadas (pneumonia, tuberculose, DPOC); indivíduos com comorbidades neurológicas associadas; indivíduos com deformidades torácicas; indivíduos com refluxo gastroesofágico; indivíduos fumantes; indivíduos com tosse crônica (tosse variante asma); estudos que avaliassem exacerbação da asma e suspeita de asma sem comprovação espirométrica (padrão-ouro).

6.1.3 Estratégia de busca

Os estudos foram obtidos a partir de uma busca sistemática nas seguintes bases de dados: *Pubmed, Cinahl, Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (Lilacs), Scopus, Web of Science, e WHO (literatura cinza)*. Uma estratégia de busca geral foi utilizada para identificar os estudos a partir dos seguintes termos e cruzamentos: PUBMED/MEDLINE: *(Asthma) AND (Nitric oxide OR Nitric oxide/use diagnostic) AND (Diagnosis OR Diagnostic OR Sensitivity and Specificity OR Accuracy OR Techniques and Procedures) AND (Spirometry)*; LILACS: *(Asthma) AND (Nitric oxide OR Nitric oxide/DU) AND (Diagnostic OR Sensitivity and Specificity OR Accuracy OR ROC curve) AND (Spirometry)*; CINAHL: *(Asthma) AND (Nitric oxide OR Exhaled nitric oxide OR) AND (Diagnostic OR Sensitivity and Specificity OR Accuracy OR Diagnostic*

accuracy OR ROC curve) AND (Spirometry). Não houve restrição linguística nem restrição de ano de publicação, visando minimizar possível viés de publicação.

6.1.4 Seleção dos estudos

A seleção dos estudos foi feita em duas fases. A primeira fase consistiu da análise dos títulos e resumos dos artigos encontrados nas bases de dados. Dois avaliadores independentes classificaram os estudos como incluídos e não incluídos, e no caso de contradições quanto às escolhas, era solicitado o parecer de um terceiro avaliador. A segunda fase da seleção consistiu da análise dos textos completos, da mesma forma que na fase anterior, realizada por dois avaliadores independentes.

Para avaliação da concordância interavaliador quanto à seleção dos artigos, foi utilizado o Índice de Concordância de *Kappa* (0,77), onde foi observada concordância substancial entre os avaliadores.

6.1.5 Extração dos dados

As variáveis extraídas dos estudos foram: autores e país de origem; critérios de inclusão; idade dos participantes; frequência de gênero; tamanho da amostra; desenho do estudo; casos de asma; padrão-ouro; forma de avaliação do óxido nítrico exalado. Para análise dos desfechos foram extraídos os dados: sensibilidade; especificidade; valor preditivo positivo; valor preditivo negativo; razão de verossimilhança positiva; razão de verossimilhança negativa e área abaixo da curva ROC.

6.1.6 Avaliação da qualidade dos artigos

A análise do risco de viés dos estudos foi realizada através dos itens da ferramenta *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies (QUADAS)* (WHITING *et al.*, 2003). A ferramenta é dividida em domínios, a primeira parte de cada domínio refere-se aos vieses e compreende três seções: 1) informação utilizada para dar suporte ao julgamento do risco de viés, 2) sinalização das perguntas, e 3) o julgamento do risco de viés. O registro das informações utilizadas para chegar ao julgamento do risco de viés visa tornar a classificação transparente e facilitar a discussão entre os autores da revisão de forma

independente. As questões são respondidas como "sim", "não", ou "incerto", e são formuladas de modo que "sim" indica baixo risco de viés, dessa forma, o risco de viés ao final é julgado como "baixo", "alto", ou "incerto". A segunda parte dos domínios refere-se à aplicabilidade. A seção é estruturada de forma semelhante, mas não incluem perguntas de sinalização. Os avaliadores registram informações dos estudos e classificam a aplicabilidade como "baixa", "alta" ou "Incerta" (WHITING *et al.*, 2003).

Os domínios da ferramenta *QUADAS* incluem: 1) Seleção dos pacientes do estudo (composto por 3 perguntas sinalizadoras e aplicabilidade); 2) Teste índice (composto por 2 perguntas sinalizadoras e aplicabilidade); 3) Padrão-ouro (composto por 2 perguntas sinalizadoras e aplicabilidade); 4) Fluxo e seguimento do estudo (3 perguntas sinalizadoras).

6.2 MÉTODO DO ESTUDO DE ACURÁCIA

6.2.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de acurácia diagnóstica, do tipo transversal prospectivo, guiado pelas recomendações do *Standard for Reporting of Diagnostic Accuracy* (STARD) (BOSSUYT *et al.*, 2003).

6.2.2 Local e período do estudo

O estudo foi desenvolvido em escolas públicas da cidade do Recife, sob anuência da Secretaria Executiva Pedagógica – Prefeitura do Recife (ANEXO I), no período de Março de 2014 a Dezembro de 2014.

6.2.3 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais do estudo foram elaborados seguindo as diretrizes da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e conduzidos de acordo com a declaração de Helsinki (1964). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CEP/CCS/UFPE sob CAAE – 21377513.5.0000.5208 (ANEXO II). Todos os pais permitiram participação voluntária de seus filhos através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 4), estiveram cientes dos objetivos e procedimentos do estudo, assim como dos riscos e

benefícios da participação de seus filhos e que a qualquer momento durante a realização do estudo, eles poderiam retirar-se do mesmo, sem nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a escola.

6.2.4 População do estudo

A população do estudo foi formada por crianças entre 3 e 5 anos, sibilantes ou não, matriculadas em escolas públicas da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil.

6.2.5 Amostra e Critérios de elegibilidade

A amostra foi constituída por crianças que frequentaram as escolas públicas sorteadas durante o período de coleta e que preenchessem os critérios de elegibilidade:

- Critérios de inclusão: idade de três a cinco anos.
- Critérios de exclusão: diagnóstico de uma doença respiratória específica (displasia broncopulmonar, fibrose cística, pneumonia, tuberculose, infecção das vias aéreas nas últimas três semanas, malformações do trato aéreo), uso de antibiótico no momento da pesquisa, doença neurológica ou genética grave, cardiopatia congênita, déficit de comunicação, incapacidade de compreensão dos comandos verbais.

6.2.6 Amostragem e cálculo do tamanho amostral

A seleção das crianças ocorreu por um processo aleatório em dois estágios. Primeiramente, foi feito levantamento das escolas públicas que possuíam alunos com a faixa etária do estudo, e por questões de operacionalização, foram visitadas as escolas pertencentes à zona norte da cidade do Recife. Foram incluídas 18 escolas no total.

O cálculo amostral foi realizado a partir dos dados dos 50 primeiros participantes. Inicialmente foram construídas duas curvas ROC com a amostra do estudo piloto para obtenção do melhor ponto de corte da FENO para diagnóstico de sibilância e de sibilância recorrente. O melhor índice de Youden para o diagnóstico de sibilância foi obtido no ponto de corte de 6ppb e para sibilância recorrente no ponto de corte de 8ppb.

Foi utilizada a fórmula simples de proporção para o cálculo de sensibilidade e especificidade de cada ponto de corte (KELSEY, 1996):

$$N = \frac{Z^2 \cdot P(1-P)}{e^2}$$

Onde, N= tamanho amostral; Z= constante relativa ao nível de confiança de 95% (1,96); P= sensibilidade ou especificidade; e= pontos percentuais de erro (5%).

Para o diagnóstico de sibilância foram encontrados valores de sensibilidade e especificidade iguais a 50% e 76,9%, respectivamente. Para o diagnóstico de sibilância recorrente foram encontrados valores de sensibilidade e especificidade iguais a 36,8% e 75%, respectivamente. A partir do cálculo para cada porcentagem, o maior valor encontrado foi de 384 indivíduos. Considerando uma perda amostral de 10%, estimou-se que 423 indivíduos seriam suficientes para representar a população.

6.2.7 Procedimentos de coletas de dados

Inicialmente, foi realizada a sensibilização e divulgação do projeto para os funcionários das escolas, pais ou responsáveis das crianças, através de comunicação oral, explicando os objetivos, justificativa e método do mesmo. Esse primeiro contato foi importante para que os profissionais envolvidos no estudo pudessem identificar as possíveis crianças elegíveis e não elegíveis ao projeto e aumentar a aderência por parte dos pais candidatos.

Ao concordarem voluntariamente em participar, foi solicitada a assinatura do TCLE, informando-os que, caso desistam da participação de suas crianças no estudo, o acompanhamento delas na escola seria realizado segundo a rotina habitual, sem prejuízo de qualquer ordem. Uma vez autorizada a participação da criança pelo responsável, foram aplicados a lista de checagem (APÊNDICE 5) e em seguida o *American Thoracic Society and Division of Lung Diseases for children questionnaire* (questionário de doenças respiratórias ATS-DLD-78-C), adaptado e previamente validado para uso no Brasil em crianças menores de 13 anos (ANEXO III). Este foi utilizado para categorizar os grupos de sibilantes dentro da amostra (padrão-ouro).

De acordo com as respostas obtidas ao questionário a amostra foi dividida

em 3 subgrupos de sibilância (DELA BIANCA *et al.*, 2010):

- Não sibilante: nenhum relato de sibilância;
- Sibilante não recorrente: até 3 episódios de sibilância nos últimos seis meses;
- Sibilante recorrente: acima de 3 episódios de sibilância nos últimos seis meses;

Posteriormente, todos foram avaliados quanto à fração exalada de óxido nítrico por profissional devidamente treinado (LBS). Todas as avaliações foram feitas respeitando a ordem de entrevistas, primeiramente, e medida da FENO, posteriormente. Apesar da falta de mascaramento quanto aos resultados do questionário de doenças respiratórias e da medida da FENO, sabe-se que os valores obtidos pela FENO retratam o grau de inflamação das vias aéreas, e portanto, não podem ser manipulados pelo avaliador. Dessa forma, trata-se de uma aferição direta, com resultados independentes do operador, o que justifica a ausência do mascaramento.

Foram colhidos de forma prospectiva, os dados completos de história clínica pregressa, dados sociodemográficos e antropométricos de todos os participantes, considerando as informações de peso e estatura as do dia da aplicação do questionário de doenças respiratórias e mensuração da FENO. Todos os testes foram realizados na própria escola e por profissional experiente (APÊNDICE 5).

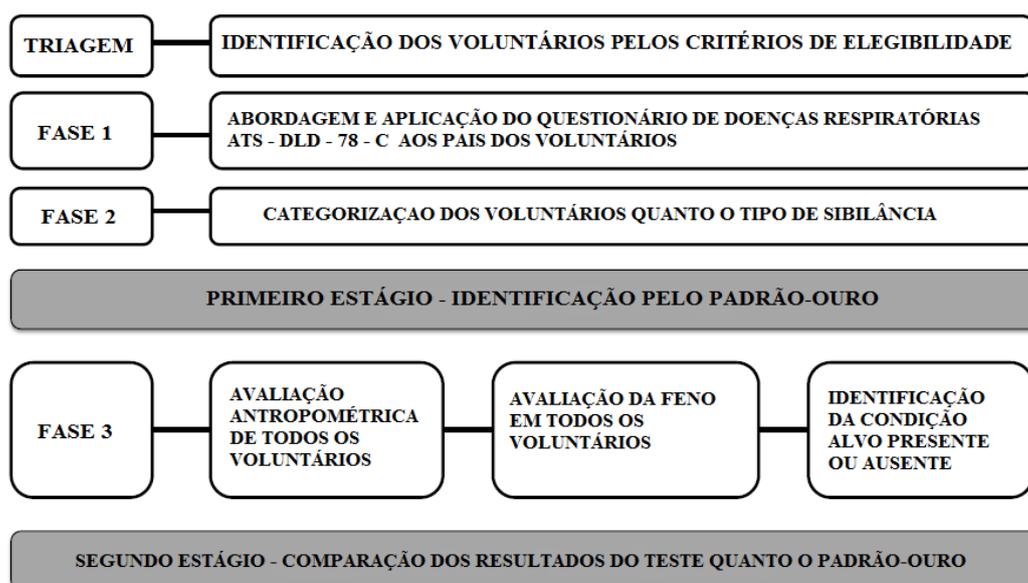


Figura 2: Delineamento metodológico do estudo.

6.2.8 Instrumentos de avaliação

6.2.8.1 Medidas Antropométricas

Foram utilizados balança digital com precisão de 100 gramas (Magna, São Paulo, Brasil) e estadiômetro (Cardiomed, São Paulo, Brasil) com precisão de 1 milímetro, para medidas de peso e altura, respectivamente. Estas foram feitas em triplicata com registro da média das mesmas, no ambiente escolar e no mesmo dia de avaliação da FENO. Esses dados foram coletados juntamente com dados pessoais, sociodemográficos e clínicos (informações sobre fumo passivo e atopia), a partir de uma lista de checagem padronizada (APÊNDICE 5).

6.2.8.2 Determinação de sibilância – Padrão-ouro

Para categorização dos participantes quanto à presença e à frequência de sibilância foi aplicado o questionário de doenças respiratórias ATS-DLD-78-C, adaptado e previamente validado para uso no Brasil em crianças menores de 13 anos, onde duas perguntas foram adicionadas sobre o número de episódios de sibilância nos últimos 6 meses e o período de surgimento do primeiro episódio. Este foi administrado a um dos pais, na própria escola, uma sessão de cada vez, até o preenchimento completo. Apenas dois entrevistadores foram responsabilizados para tal função onde foram acordadas orientações quanto à impossibilidade de conselhos sobre as respostas dos entrevistados ou influência sobre mudanças nas respostas dos mesmos.

Os entrevistadores foram treinados a seguirem passos sistemáticos para obtenção das respostas ao questionário:

1. Leitura da pergunta, calmamente, exatamente como está escrita;
2. Na presença de dúvidas, encorajamento do entrevistado a pensar sobre o seu significado;
3. Na persistência de dúvidas, fornecimento de breve informação sem explicação da resposta requerida;
4. Na impossibilidade em responder a questão, marcação do campo correspondente à resposta desconhecida.

6.2.8.3 Avaliação da Fração exalada de óxido nítrico

Para a população alvo do estudo (pré-escolares entre 3 e 5 anos), o método de medição *online* da FENO durante a respiração espontânea é o recomendado pela ATS/ERS (2005). As crianças posicionaram-se confortavelmente sentadas, respirando de forma lenta e regular através de um bocal conectado a uma válvula de duas vias. A FENO foi mensurada em tempo real durante a respiração espontânea no momento em que a taxa de fluxo exalatória, ajustada pela mudança da resistência, alcançou uma média de 50 ml/s (variando entre 40-60). A duração da exalação necessária para alcançar um nível estável de NO foi de mínimo 6s, de acordo com os critérios de reprodutibilidade e aceitabilidade descritos pela ATS/ERS (2005).

Esse método necessitou de cooperação passiva da criança, mas o uso de biofeedback visual permitiu que a mesma visualizasse seu padrão de respiração, facilitando o alcance do fluxo ideal. Foi utilizado o dispositivo portátil da marca NIOX MINO® Aerocrine. Este aparelho apresenta uma boa combinação de portabilidade, recursos técnicos, telas de incentivo para crianças e registro das medições da fração expirada de óxido nítrico.



Figura 3: Avaliação da FENO pelo equipamento NIOX MINO® Aerocrine. Fonte: acervo próprio.

6.2.9 Medidas de desfechos

O presente estudo teve como desfechos:

6.2.9.1 Desfecho primário

Diagnóstico de sibilância e sibilância recorrente pela medida da fração exalada de óxido nítrico em comparação ao padrão-ouro.

6.2.9.2 Desfecho secundário

Influência dos elevados valores de FENO nos fatores de risco para sibilância em pré-escolares.

6.2.10 Operacionalização das variáveis

6.2.10.1 Variável dependente

- Fração exalada de óxido nítrico: Mediador biológico presente no gás exalado de humanos, envolvido nos processos de inflamação e imunidade mediada por célula. Variável quantitativa contínua, expressa em partes por bilhão (ppb), avaliada pelo pesquisador.

6.2.10.2 Variáveis independentes sociodemográficas

- Procedência: Variável qualitativa nominal do tipo policotômica expressando a região de onde a criança veio: Recife e Região Metropolitana do Recife, Interior, Outro.
- Total de pessoas que moram na casa: variável quantitativa discreta, expressa em números inteiros.
- Idade materna: variável quantitativa contínua, expressa em anos.
- Instrução materna: variável qualitativa ordinal categorizada quanto ao grau de escolaridade da mãe: (1) sem instrução, (2) primeiro grau incompleto, (3) primeiro grau completo, (3) segundo grau incompleto, (4) segundo grau completo e (5) superior.
- Estado civil: Variável qualitativa nominal do tipo policotômica expressa em: Casada, Solteira, Separada ou Divorciada, Viúva, Vive junto.
- Renda familiar mensal: variável numérica contínua, categorizada em quartis. Expressa a renda mensal total da família considerando o somatório da renda formal do chefe de família, a renda informal do chefe de família, a renda de outros moradores da casa e a renda de auxílio do governo.

6.2.10.3 Variáveis independentes clínicas:

- Presença de sibilância: Sintoma respiratório comum em crianças que pode expressar doenças localizadas nas vias respiratórias. Variável qualitativa nominal do tipo dicotômica, expressa em presente ou ausente.
- Tipo de sibilância: Corresponde a frequência de episódios de sibilância nos últimos seis meses. Variável qualitativa ordinal, expressa como: (1) não sibilante; (2) sibilante não recorrente; (3) sibilante recorrente. Baseado no questionário de doenças respiratórias.
- Idade: variável quantitativa contínua, expressa em meses. Conforme informação dos pais no momento da seleção da criança ao estudo.
- Sexo: variável qualitativa nominal do tipo dicotômica, expressa como feminino e masculino.
- Cor: variável qualitativa nominal do tipo policotômica, expressa em branca, amarela, negra, parda, outra, e não sabe. Definida através de opinião do responsável.
- Altura: variável quantitativa contínua, expressa em centímetros, com duas casas decimais. Mensurado pelo pesquisador no momento da avaliação da criança.
- Peso: variável quantitativa contínua, expressa em quilogramas, com uma casa decimal. Mensurado pelo pesquisador no momento da avaliação da criança.
- Antecedentes pessoais e familiares de atopia: Histórico de doenças alérgicas. Variável qualitativa nominal do tipo dicotômica, expressa em sim ou não.
- Fumo passivo: Corresponde ao indivíduo que não fuma, mas está exposto à fumaça de cigarro daqueles que convivem por perto. Variável qualitativa nominal do tipo dicotômica, expressa em sim ou não.
- Internação hospitalar por pneumonia e/ou bronquiolite prévia: Histórico de infecção respiratória ou inflamação nos bronquíolos causada por agentes virais. Variável qualitativa nominal do tipo dicotômica, expressa como sim ou não referido pelo responsável.
- Uso de corticosteroide inalatório e/ou oral: Anti-inflamatórios recomendados para a prevenção ou controle dos sintomas da asma.

Variável qualitativa nominal do tipo dicotômica, expressa como sim ou não.

- Aleitamento materno: Histórico de alimentação através do leite materno nos primeiros meses de vida. Variável qualitativa nominal do tipo dicotômica, expressa como sim ou não.
- Tempo de aleitamento materno: Variável quantitativa discreta, expressa em meses.

6.2.11 Fluxograma de captação e acompanhamento dos participantes

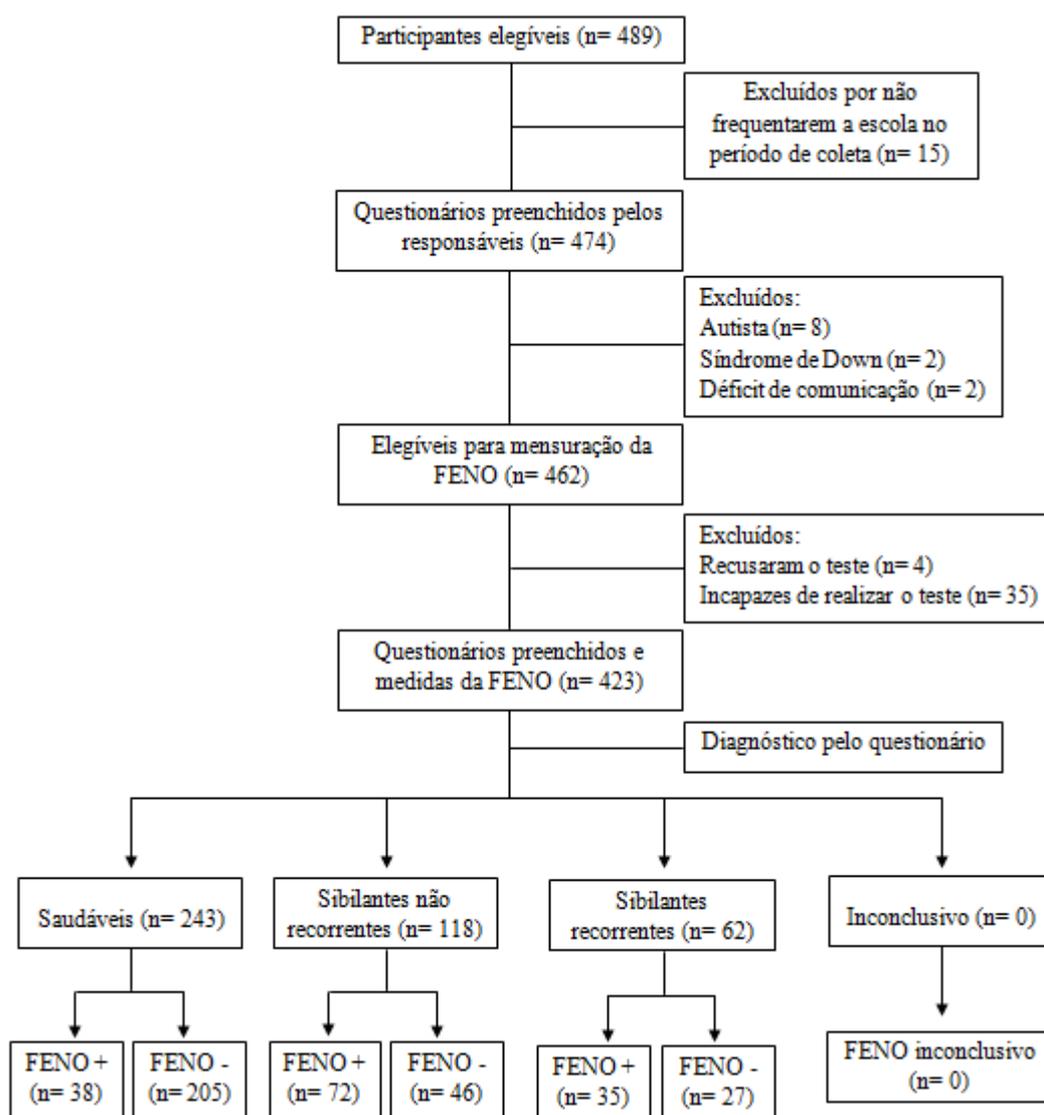


Figura 4: Fluxograma de captação e acompanhamento dos participantes de acordo com o STARD.

6.2.12 Processamento e análise dos dados

Os dados do artigo 1 foram analisados quanto ao risco de viés através dos itens da ferramenta *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies (QUADAS)*. A metanálise foi realizada (M-H, Modelo Randômico, 95% IC) para determinar o odds ratio (OR) da FENO no diagnóstico de asma e asma atópica entre os 7 manuscritos selecionados. Todos os dados foram avaliados utilizando o software Review Manager (RevMan) versão 5.3 (Copenhague, Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2014).

No artigo 2 Foi realizada uma análise descritiva para a caracterização da amostra, utilizando média \pm desvio padrão para as variáveis: idade, peso, altura, tempo de amamentação exclusiva em meses e valor de FENO. As demais variáveis descritivas foram expressas em frequência (%).

Foram construídas tabelas 2x2 para cada ponto de corte de FENO no diagnóstico de sibilância e sibilância recorrente, para análise de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva e razão de verossimilhança negativa. Posteriormente foi construída uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para cada ponto de corte.

Para análise dos dados do artigo 3 foram calculadas medidas descritivas tais como: proporções, médias, OR e intervalos de confiança. Para explicar o desenvolvimento da sibilância foram feitas análises bidimensionais utilizando Teste de independência de Pearson ou Teste de Mann-Whitney para comparar médias de variáveis não normais. Para análise multivariada dos possíveis fatores explicativos para a sibilância, foi usado um modelo de regressão logística binária calculando-se os valores da OR ajustada bem como das probabilidades estimadas para desenvolver sibilância. O nível de significância adotado para todas as medidas foi de $p \leq 0,05$. Os dados coletados foram tabulados no Microsoft Office Excel® 2007 e a análise estatística realizada através do software SPSS® 20.0.

7. RESULTADOS

Os resultados da pesquisa originaram três artigos científicos originais:

7.1 Artigo 1: “*Acurácia da fração exalada do óxido nítrico no diagnóstico de asma infantil: uma metanálise*” que será submetido ao *JOURNAL OF PEDIATRICS* (qualis A1 para área 21 da CAPES).

7.2 Artigo 2: “*Óxido nítrico exalado como ferramenta diagnóstica para sibilância em crianças pré-escolares*” que será submetido à revista *CHEST* (qualis A1 para área 21 da CAPES).

7.3 Artigo 3: “*Fatores de risco envolvidos no aumento da probabilidade para sibilância em pré-escolares*” que será submetido à revista *PEDIATRICS* (qualis A1 para área 21 da CAPES).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta dissertação demonstram que a medida da fração exalada de óxido nítrico parece ser uma ferramenta acurada para diferenciar pré-escolares sibilantes e não sibilantes pelo ponto de corte 6 ppb e diferenciar pré-escolares com sibilância recorrente dos sibilantes não recorrentes pelo ponto de corte de 10 ppb devido ao aumento da probabilidade diagnóstica após o teste da FENO. Assim, esta medida se mostrou útil para identificar mudanças sintomatológicas na prática clínica e estabelecer parâmetros diagnósticos na pesquisa.

O valor de FENO também foi relacionado ao risco para desenvolvimento da sibilância. Crianças que apresentem valores iguais ou superiores a 10 ppb encontram-se em risco 10 vezes maior para o quadro sintomatológico quando comparada às que não atinjam esta medida. Sendo assim, avaliar pré-escolares através da medida da fração exalada do óxido nítrico pode ser uma alternativa útil para o diagnóstico, intervenção, controle e acompanhamento precoce de crianças com risco potencial para sibilância.

REFERÊNCIAS

ABBA, A.A. Exhaled nitric oxide in diagnosis and management of respiratory diseases. **Ann Thorac Med**, 4(4): 173–81, 2009.

American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS). Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, 171(8): 912–30, 2005.

BACHARIER, L.B.; BONER, A.; CARLSEN, K-H.; et al. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. **Allergy**, 63(1): 5-34, 2008.

BACHARIER, L.B. Evaluation of the child with recurrent wheezing. **J Allergy Clin Immunol**, 128(3): 690–95, 2011.

BEEN, J.V.; LUGTENBERG, M. J.; SMETS, E.; et al. Preterm birth and childhood wheezing disorders: a systematic review and meta-Analysis. **PLoS Med**, 11(1): 1-18, 2014.

BENER, A.; EHLAYEL, M.S.; ALSOWAIDI, S.; SABBAH, A. Role of breast feeding in primary prevention of asthma and allergic diseases in a traditional society. **Eur Ann Allergy Clin Immunol**, 39(10): 337-43, 2007.

BEVER, H.P.V; HAN, E.; SHEK, L.; YI CHNG, S.; GOH, D. An Approach to preschool wheezing: to label as asthma? **World Allergy Organ J**, 3(11): 253–57, 2010.

BEYDON, N.; DAVIS, S.D.; LOMBARDI, E.; et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: pulmonary function testing in preschool children. **Am J Respir Crit Care Med**, 175(12): 1304–45, 2007.

BHATT, J.M.; SMYTH, A.R. The management of preschool wheeze. **Paediatr Respir Rev**, 12(1): 70–7, 2011.

BORREGO, L.M.; COUTO, M.; ALMEIDA, I.; MORAIS-ALMEIDA, M. Espirometria em idade pré-escolar na prática clínica. **Rev Port Imunoalergologia**, 20(1): 23–31, 2012.

BOSSUYT, P.; REITSMA, J.; BRUNS. D; et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. **Ann Intern Med**, 138(1): 1–12, 2003.

BRAND, P.; BARALDI, E.; BISGAARD, H.; et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. **Eur Respir J**, 32(4): 1096-110, 2008.

BRUSSEE, J.E.; SMIT, H.A; KERKHOF, M.; et al. Exhaled nitric oxide in 4-year-old children: relationship with asthma and atopy. **Eur Respir J**, 25(3): 455–61, 2005.

BURITY, E.F.; PEREIRA, C.A.C.; RIZZO, J.A.; BRITO, M.C.A; SARINHO, E.S.C. Reference values for spirometry in preschool children. **J Pediatr**, 89(4): 374–80, 2013.

CANE, R.S; RANGANATHAN, S.C.; MCKENZIE, S.A. What do parents of wheezy children understand by “wheeze”? **Arch Dis Child**, 82(4): 327–32, 2000.

CANO-GARCINUÑO, A.; MORA-GANDARILLAS, I.; GROUP, S. Wheezing phenotypes in young children : an historical cohort study. **Prim Care Respir J**, 23(1): 60–66, 2014.

CAUDRI, D.; SAVENIJE, O.E.M.; SMIT, H.A; et al. Perinatal risk factors for wheezing phenotypes in the first 8 years of life. **Clin Exp Allergy**, 43(12): 1395–405, 2013.

DEBLEY, J.; FILBRUN, A.G.; SUBBARAO, P. Clinical applications of pediatric pulmonary function testing: lung function in recurrent wheezing and asthma. **Pediatr Allergy Immunol Pulmonol**, 24(2): 69-76, 2011.

DELA BIANCA, A.C.C.; WANDALSEN, G.F.; SOLÉ, D. Wheezing infant: prevalence and risk factors. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol**, 33(2): 43–50, 2010.

DELA BIANCA, A.C.C.; WANDALSEN, G. F.; MIYAGI, K.; et al. Prevalence of wheezing in infants: propose of study. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol**, 30(3): 94-100, 2007.

DUCHARME, F.; TSE, S.M.; CHAUHAN, B. Diagnosis, management, and prognosis of preschool wheeze. **Lancet**, 383(3): 1593-604, 2014.

DUIJTS, I.; JADDOE, V.W.V; VAN DER VALK, R.J.P.; HENDERSON, J.A.; et al. Fetal exposure to maternal and paternal smoking and the risks of wheezing in preschool children. **Chest**, 141(4): 876-85, 2012.

FERRANTE, G.; MALIZIA, V.; ANTONA, R.; CORSELLO, G.; LA GRUTTA, S. The value of FeNO measurement in childhood asthma: uncertainties and perspectives. **Multidiscip Respir Med**, 8(1): 1-8, 2013.

FITZGERALD, M.; BATEMAN, E.D.; BOULET, L.P.; CRUZ, A.; HAAHTELA, T.; LEVY, M.; et al. Pocket guide for asthma management and prevention. **Global Initiative for Asthma**, 1-27, 2012.

FRIEDMAN, T. Diagnosing asthma in young children: current research & recommendations. **J Pediatr Health Care**, 24(5): 305–11, 2010.

FRÍGULS, B.; GARCÍA-ALGAR, O.; PUIG, C.; FIGUEROA, C.; SUNYER J.; VALL, O. Perinatal exposure to tobacco and respiratory and allergy symptoms in first years of life. **Arch Bronconeumol**, 45(12): 585-90, 2009.

GABRIELE, C.; NIEUWHOF, E.M.; VAN DER WIEL, E.C.; et al. Exhaled nitric oxide differentiates airway diseases in the first two years of life. **Pediatr Res**, 60(4): 461–5, 2006.

GARCIA-MARCOS, L.; MALLOL, J.; SOLÉ, D.; BRAND, P.L.P; EISL Study Group. International study of wheezing in infants: risk factors in affluent and non-affluent countries during the first year of life. **Pediatr Allergy Immunol**, 21(5): 878-88, 2010.

GUIBAS, G.V.; XEPAPADAKI, P.; MOSCHONIS, G.; et al. Breastfeeding and wheeze prevalence in pre-schoolers and pre-adolescents: The Genesis and Healthy Growth studies. **Pediatr Allergy Immunol**, 24(8): 772–81, 2013.

HARRISON, J.; GIBSON, A.M.; JOHNSON, K.; SINGH, G.; SKORIC, B.; RANGANATHAN, S. Lung function in preschool children with a history of wheezing measured by forced oscillation and plethysmographic specific airway resistance. **Pediatr Pulmonol**, 45(11): 1049–56, 2010.

KELSEY JL. *Methods in observational epidemiology*, 2nd ed. Oxford University Press, New York, NY, 1996.

KONSTANTINOOU, G.N.; XEPAPADAKI, P.; MANOUSAKIS, E.; et al. Assessment of airflow limitation, airway inflammation, and symptoms during virus-induced wheezing episodes in 4- to 6-year-old children. **J Allergy Clin Immunol**, 131(1): 87–93, 2013.

KOOPMAN, M.; ARETS, H.G.M.; UITERWAAL, C.S.P.M.; ENT, C. VAN DER ENT, C.K. Comparing 6 and 10 sec exhalation time in exhaled nitric oxide measurements in children. **Pediatr Pulmonol**, 44(4): 340–4, 2009.

LIMA, J.A.B.; FISCHER, G.B.; SARRIA, E.E.; MATTIELLO, R.; SOLÉ, D. Prevalence of and risk factors for wheezing in the first year of life. **J Bras Pneumol**, 36(5): 525-31, 2010.

LODGE, C.J.; ZALOUMIS, S.; LOWE, A.J.; et al. Early-life risk factors for childhood wheeze phenotypes in a high-risk birth cohort. **J Pediatr**, 164(2): 289–94, 2014.

LOPES, C.; FONSECA, J.; SILVA, J.P.M.; CASTEL-BRANCO, M.G. Exhaled nitric oxide: clinical use in asthma. **Rev Port Imunoalergologia**, 13(1): 7–17, 2005.

LOWE, L.A.; SIMPSON, A.; WOODCOCK, A.; et al. Wheeze phenotypes and lung function in preschool children. **Am J Respir Crit Care Med**, 171(20): 231-37, 2005.

MALLOL, J.; GARCÍA-MARCOS, L.; SOLÉ, D.; BRAND, P; EISL Study Group. International prevalence of recurrent wheezing during the first year of life: variability, treatment patterns and use of health resources. **Thorax**, 65(11): 1004-9, 2010.

MALMBERG, L.P.; PELKONEN, A.S.; HAAHTELA, T.; TURPEINEN, M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. **Thorax**, 58(6): 494–99, 2003.

MANNA, A.; CAFFARELLI, C.; VARINI, M.; et al. Clinical application of exhaled nitric oxide measurement in pediatric lung diseases. **Ital J Pediatr**, 38(74): 1-10, 2012.

MARTINEZ, F.D. What have we learned from the Tucson children's respiratory study? **Paediatr Respir Rev**, 3(3): 193-7, 2002.

MARTINEZ, F.D.; WRIGHT, A.L.; TAUSSIG, L.M.; HOLBERG, C.J.; HALONEN, M.; MORGAN, W.J. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. **N Engl J Med**, 332(3): 133-8, 1995.

MEDEIROS, D.; SILVA, A.R.; RIZZO, J.A.; SARINHO, E.; MALLOL, J.; SOLÉ, D. Prevalence of wheezing and associated risk factors among infants in Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cad Saúde Pública**, 27(8): 1551-59, 2011.

MENZIES, D.; NAIR, A.; LIPWORTH, B.J. Portable exhaled nitric oxide measurement: Comparison with the "gold standard" technique. **Chest**, 131(2): 410–4, 2007.

MOELLER, A.; DIEFENBACHER, C.; LEHMANN, A.; et al. Exhaled nitric oxide distinguishes between subgroups of preschool children with respiratory symptoms. **J Allergy Clin Immunol**, 121(3): 705–9, 2008.

MOTOMURA, C.; ODAJIMA, H.; TEZUKA, J.; et al. Effect of age on relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness in asthmatic children. **Chest**, 136(2): 519–25, 2009.

MUIÑO, A.; MENEZES, A.M.; REICHERT, F.F.; DUQUIA, R.P.; CHATKIN, M. Wheezing phenotypes from birth to adolescence: a cohort study in Pelotas, Brazil, 1993-2004. **J Bras Pneumol**, 34(6): 347-55, 2008.

NETO, H.J.C.; ROSÁRIO, N.A.; SOLÉ, D.; MALLOL, J. Prevalence of recurrent wheezing in infants. **J Pediatr**, 83(4): 357-62, 2007.

NETO, H.J.C.; ROSÁRIO, N.A. Wheezing in infancy: epidemiology, investigation, and treatment. **J Pediatr**, 86(3): 171-78, 2010.

OH, M.-A.; SHIM, J.Y.; JUNG, Y.-H.; et al. Fraction of exhaled nitric oxide and wheezing phenotypes in preschool children. **Pediatr Pulmonol**, 48(6): 563–70, 2013.

OOSTVEEN, E.; DOM, S.; DESAGER, K.; HAGENDORENS, M.; DE BACKER, W.; WEYLER, J. Lung function and bronchodilator response in 4-year-old children with different wheezing phenotypes. **Eur Respir J**, 35(4): 865–72, 2010.

PEÑA ZARZA, J.A.; OSONA, B.; GIL-SANCHEZ, J.A.; FIGUEROLA, J. Exhaled nitric oxide in acute phase of bronchiolitis and its relation with episodes of subsequent wheezing in children of preschool age. **Pediatr Allergy Immunol Pulmonol**, 25(2): 92–6, 2012.

PISI, R.; AIELLO, M.; TZANI, P.; MARANGIO, E.; OLIVIERI, D.; CHETTA, A. Measurement of fractional exhaled nitric oxide by a new portable device: comparison with the standard technique. **J Asthma**, 47(7): 805–9, 2010.

PRADO, O.S.; PÉREZ-YARZA, E.G.; RUIZ, A.A.; et al. Fraction of exhaled nitric oxide and asthma predictive index in infants less than two years-old. **Arch Bronconeumol**, 47(5): 234–8, 2011.

PRICE, D.; RYAN, D.; BURDEN, A.; et al. Using fractional exhaled nitric oxide (FeNO) to diagnose steroid-responsive disease and guide asthma management in routine care. **Clin Transl Allergy**, 3(1): 1-10, 2013.

ROCHA, A.; DONADIO, M.V.F.; ÁVILA, D.V.; HOMMERDING, P.X.; MAROSTICA, P.J.C. Using the interrupter technique to evaluate airway resistance in cystic fibrosis patients. **J Bras Pneumol**, 38(2): 188-93, 2012.

ROSENFELD, M.; ALLEN, J.; ARETS, B.H.; et al. An official American Thoracic Society workshop report: Optimal lung function tests for monitoring cystic fibrosis, bronchopulmonary dysplasia, and recurrent wheezing in children less than 6 years of age. **Ann Am Thorac Soc**, 10(2): 1–11, 2013.

SAGLANI, S.; MCKENZIE, S.A.; BUSH, A.; PAYNE, D.N. A video questionnaire identifies upper airway abnormalities in preschool children with reported wheeze. **Arch Dis Child**, 90: 961–64, 2005.

SINGER, F.; LUCHSINGER, I.; INCI, D.; et al. Exhaled nitric oxide in symptomatic children at preschool age predicts later asthma. **Allergy**, 68(4): 531–38, 2013.

SOLÉ, D. Childhood wheezing. **J Bras Pneumol**, 34(6): 337-39, 2008.

SONNAPPA, S.; BASTARDO, C.M.; WADE, A.; et al. Symptom-pattern phenotype and pulmonary function in preschool wheezers. **J Allergy Clin Immunol**, 126(3): 519–26, 2010.

TENERO, L.; TEZZA, G.; CATTAZZO, E.; PIACENTINI, G. Wheezing in preschool children. **Early Hum Dev**, 89(3): 13-17, 2013.

THAMRIN, C.; GANGELL, C.L.; UDOMITTIPONG, K.; et al. Assessment of bronchodilator responsiveness in preschool children using forced oscillations. **Thorax**, 62(9): 814–19, 2007.

VISSER, C.A.; GARCIA-MARCOS, L.; EGGINK, J.; BRAND, P.L. Prevalence and risk factors of wheeze in Dutch infants in their first year of life. **Pediatr Pulmonol**, 45(2): 149-56, 2010.

WHITING, P.; RUTJES, A.W.; REITSMA, J.B.; BOSSUYT, P.M.; KLEIJNEN, J. The development of QUADAS : a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. **BMC Med Res Methodol**, 10(3): 1–13, 2003.

WRIGHT, R.J.; COHEN, S.; CAREY, V.; WEISS, S.T.; GOLD, D.R. Parental Stress as a Predictor of Wheezing in Infancy A Prospective Birth-Cohort Study. **Am J Respir Crit Care Med**, 165(3): 358–65, 2002.

ZHANG, H.; SHU, L.; CAI, X.; et al. Gender and age affect the levels of exhaled nitric oxide in healthy children. **Exp Ther Med**, 5(4): 1174–78, 2013.

APÊNDICE 1 – ARTICLE 1

**EXHALED NITRIC OXIDE ACCURACY IN CHILDHOOD ASTHMA
DIAGNOSIS: A META-ANALYSIS**

To be submitted:

THE JOURNAL OF PEDIATRICS

EXHALED NITRIC OXIDE ACCURACY IN CHILDHOOD ASTHMA DIAGNOSIS: A META-ANALYSIS

Larissa Bouwman Sayão¹, Armèle Dornelas de Andrade¹, Marcely Kellyane F. Barros¹, Murilo Carlos Amorim de Britto².

¹Universidade Federal de Pernambuco – Laboratório de Fisiologia e Fisioterapia Cardiopulmonar – Recife – Brasil.

²Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife-PE, Brasil

Corresponding author:

Armèle Dornelas de Andrade

armeledornelas@yahoo.com

Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Fisioterapia

Av. Jorn. Aníbal Fernandes, s/n. Cidade Universitária.

CEP: 50740-560 - Recife – PE (BRA)

ABSTRACT

Introduction / Purpose: Running reproducible curves on spirometry requires patient's understanding and cooperation, therefore, can restrict its diagnostic applicability in children. The purpose of this study was to determine the diagnostic accuracy of exhaled nitric oxide fraction (FeNO) as an add-on test to spirometry in the assessment of asthma in childhood.

Methods: Systematic search of the databases: Pubmed, Lilacs, CINAHL, Web of Science and was performed by 2 independent evaluators. Were included diagnostic accuracy studies of FeNO carried out in children between 5 and 18 years old with atopic or non-atopic asthma who were diagnosed by spirometry. We included studies irrespective of language, publication status, or study design (prospective or retrospective). We excluded case-control studies. The selected final articles were analyzed to determine the risk of bias by QUADAS-2 tool.

Results: Thirty-nine articles were eligible for the study. Following the application of the inclusion criteria for the title, abstract and full text, seven articles remained for analysis, found in the databases PUBMED (1), CINAHL (1) and SCOPUS (5), resulting in a sample of 7,900 children and adolescents, of which 3,722 were asthmatics. Based on the best sensitivity - specificity, the cutoff point for the diagnosis of asthma in children 5-18 years was ≥ 19 parts per billion (ppb), while diagnosis of atopic asthma in this same age group was ≥ 22 ppb.

Conclusion: FeNO is a simple and non-invasive method which can contribute to the diagnosis of asthma in young children. However, further studies are necessary to standardize the cutoff points for different age subgroups.

Keywords: Sensitivity and specificity, lung function, spirometry, exhaled nitric oxide, child and meta-analysis.

INTRODUCTION

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by bronchial obstruction, spontaneously reversible or by pharmacological intervention, associated with increased bronchial responsiveness to different stimuli (environmental, occupational or genetic). The conventional clinical diagnosis is based on symptoms reported by patient, bronchodilator response by spirometry (increase in $FEV_1 \geq 12\%$), or bronchial hyperresponsiveness by bronchial provocation tests ($\geq 20\%$ FEV_1 reduction after methacholine administration). Performing these tests requires patient cooperation and understanding of procedures as well as technician training for reproducible measurements (VAN DE KANT et al., 2009; FRIEDMAN, 2010; OLIN & WECHSLER, 2014).

Given the requirement of these tests and the possibility of false diagnoses or sub diagnoses, measurement of exhaled nitric oxide fraction (FeNO) has been proposed to be useful for asthma diagnosis, especially among young children (VAN DE Kant et al., 2009; FRIEDMAN, 2010).

FeNO is an easy, practical, well tolerated and non-invasive technique which quantifies the degree of eosinophilic inflammation in the lower airway. Consequently FeNO can be considered as an innovator tool for clinical practice to provide information of monitoring asthma inflammatory components during the disease course. Previous studies show that children with asthma have higher FeNO values when compared to non-asthmatic and that this relationship is stronger in cases of atopic asthma (ABBA, 2009; PRADO et al., 2011; MANNA et al., 2012; JANG et al., 2013).

The usefulness of FeNO as an accurate diagnostic tool in cases of childhood asthma is still questionable. Conflicting results are reported in the literature as possible diagnostic yield of FeNO mainly due to different methodological processes employed. Considering the importance of early asthma diagnosis and its impact on the potential control of the disease over the years, this systematic review was carried out to evaluate the FeNO's accuracy in asthma diagnosis compared to the spirometry that is considered as gold standard.

METHOD

Eligibility criteria

We included cross-sectional and cohort studies of diagnostic accuracy carried out in children between 5 and 18 years old with atopic or non-atopic asthma, who were diagnosed by spirometry and FeNO. We excluded the following studies: (1) abstracts, editorials, reviews, and case reports; (2) studies describing reports of individuals with respiratory comorbidities (i.e. pneumonia, tuberculosis, COPD), neurological comorbidities, thoracic deformities, and gastroesophageal reflux; (3) studies reporting smokers; (4) studies describing individuals with chronic cough or cough variant asthma; and (5) studies describing asthma exacerbation and suspected asthma without spirometric evidence (gold standard).

Search strategy

Studies were obtained from a systematic search using the following databases: *Pubmed, Cinahl, Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (Lilacs), Scopus, Web of Science and WHO*. A general search strategy was used to identify studies with the following terms and crossings: PUBMED/MEDLINE: *(Asthma) AND (Nitric oxide OR Nitric oxide/use diagnostic) AND (Diagnosis OR Diagnostic OR Sensitivity and Specificity OR Accuracy OR Techniques and Procedures) AND (Spirometry)*; LILACS: *(Asthma) AND (Nitric oxide OR Nitric oxide/DU) AND (Diagnostic OR Sensitivity and Specificity OR Accuracy OR ROC curve) AND (Spirometry)*; CINAHL: *(Asthma) AND (Nitric oxide OR Exhaled nitric oxide OR) AND (Diagnostic OR Sensitivity and Specificity OR Accuracy OR Diagnostic accuracy OR ROC curve) AND (Spirometry)*. No restriction in language and year of publication was used in order to minimize possible publication bias.

Study selection

We included all studies irrespective of the language of publication and publication status. If non-English articles were found, we obtained translations. Two authors (LBS and MKB) independently searched the references to identify relevant studies. We obtained the full texts for references considered relevant by at least one of the authors. Two authors screened the full text papers against the inclusion criteria. Any differences in study selection were arbitrated by ADA.

To evaluate the inter-rater agreement on article selection, the Kappa concordance index was used and an index score of 0.77, showed a substantial agreement among evaluators. As shown in Figure 1, the studies were excluded according to criteria including: inadequate method, inappropriate topic, inadequate age, absence of spirometry and control group.

Data extraction

Two authors independently extracted the following data from each included study, and any differences were resolved by discussion with ADA. Table 1 shows variables extracted from the studies such as: first author, year of publication, country, inclusion criteria, age and sex of participants, sample size, design of the study, number of asthma cases, description of the reference standard and description of the index test. Data extracted for outcome analysis were: FeNO cut-off measures in parts per billion (ppb), sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), positive likelihood ratio (LR+), negative likelihood ratio (LR-) and area under of ROC curve (Table 2).

Assessment of methodological quality

Two authors (LBS and MKB) independently assessed study quality using the revised Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 tool (QUADAS-2). Any differences were resolved by ADA. The tool consists of four key domains: (1) Patient selection, (2) FeNO/index test, (3) Spirometry test/Reference standard, and (4) Flow and timing of studies. All domains were evaluated based on bias risk that was included signal questions used to support the evaluators' judgment on bias risk. Signal questions were answered as "yes", "no" or "unclear" and bias risk was classified as "low bias risk", "high bias risk" or "uncertain bias risk," respectively. The information used to determine judgment on bias risk aimed to make classification independently by each evaluator and facilitate discussion between them.

The first three domains were also evaluated based on applicability issue. This evaluation was structured similar to the assessment of bias risk, but did not include signal questions. Evaluators recorded information on each study and rated applicability as "low concern", "high concern" or "uncertain concern" (WHITING, 2006; WHITING, 2011). The data for the individual studies were

entered in the statistical package Review Manager (RevMan) version 5.3 (Copenhagen, Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2014) and the methodological quality graph was constructed for all the included studies. The QUADAS-2 tool analysis is shown in Table 3 and represented in Figures 2 and 3.

Statistical analyses and data synthesis

Meta-analysis was performed (M-H, Random model, 95% CI) to determine odds ratio (OR) of FeNO in the diagnosis of asthma and atopic asthma across the 7 selected manuscripts. Data analysis of this study was performed using Review Manager (RevMan) version 5.3 (Copenhagen, Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2014).

RESULTS

Of all 1,499 articles found in the literature search, 39 articles were selected based on information found in the title and abstract of each study. After reviewing the full text, 32 articles were excluded because of inadequate age (22 articles), and absence of spirometry (9 articles) or control group (1 article). The remaining seven articles that were found in databases such as PUBMED (1 article), CINAHL (1 article) and SCOPUS (5 articles), included a sample of 7,900 children and adolescents, of which 3,722 were patients with asthma. The general characteristics of the studies are presented in Tables 1 and 2.

The studies that were included in this meta-analysis were conducted in: Poland, Korea, China, Spain, Norway and Israel. Among the designs found there were retrospective cross-sectional studies (2), prospective cross-sectional studies (4) and cohort study (1), all of them adopted spirometry associated with the clinical history to gold standard for asthma diagnosis. The age of participants ranged from 5 to 18 years old. All studies except for Yao et al. had higher number of males than female participants and the prevalence of asthma ranged from 4% to 70% across studies. As for exhaled nitric oxide assessment, all studies used the online simple exhalation method based on constant flow rate of 50 ml/s during measurement according to recommendations of the ATS/ERS (2005). No study reported information about the calibration process.

As for accuracy outcomes, the cut-off point for asthma diagnosis ranged from 6.7-28 parts per billion (ppb). The overall sensitivity varied between 35% and 90%, while full specificity ranged between 38% and 94%. Higher values were observed in atopic asthma diagnosis. The total positive predictive value ranged between 8.8% and 92% while the negative predictive value ranged between 30.7% and 98.3%. The highest and lowest positive likelihood ratio was 7.8 and 1.0, respectively while the negative likelihood ratio ranged from 0.15 to 1.04. The AUC ROC curve ranged from 0.53 to 0.93 with the exception of the study of Jerzynska et al. (2014) which did not report any information about this outcome.

The best FeNO cut-off point that expressed the relative sensitivity and specificity for the non-atopic asthma diagnosis was reported by Perez Tarazona et al. (2011) (Figure 4), while the best cut-off point between healthy individuals and patients with atopic asthma was seen in the study conducted by Woo et al. (2012) (Figure 5).

Methodological quality of selected articles

The inclusion criteria were clearly defined in all articles that included individuals who were capable of performing diagnostic tests and had similar characteristics to the population. All studies except for Yao et al. (2011) used spirometry as the gold standard after use of bronchodilator or bronchial provocation test. Studies were classified as high bias risk due to lack of information about sample size calculation, appropriate time allocation between tests (index and the gold standard), blinding during the performance and interpretation of tests, and lack of information about pre-test asthma probability in each population for adequate likelihood ratios interpretation. All studies presented the protocol of FeNO test.

The measures of index test and gold standard were performed by all study participants, however, in the Yao et al. (2011) study, only 98.1% of the sample could achieve reproducible measurements for pulmonary function test. As to statistical analysis, three studies did not include all participants, and did not provide any information for reason of study attrition. Also, they did not report analysis by intention to treat, resulting in high bias risk (Table 3).

Meta-analysis

The odds ratio (OR) of FeNO as a diagnostic measure for asthma and atopic asthma is shown in Figures 6 and 7, respectively.

DISCUSSION

This is the first systematic review that summarizes diagnostic accuracy of FeNO in childhood asthma compared to spirometry. All seven articles included in this study followed the recommendations of the American Thoracic Society / European Respiratory Society on the protocol for the FeNO measurement and four of them evaluated the diagnosis power of asthma associated and not associated with atopy (ATS / ERS, 2005).

All sensitivity FeNO values were higher when asthma diagnosis was related to atopy, which shows greater power to detect the true cases. These findings are in agreement with the conclusion of another systematic review of allergic rhinitis and atopy influences in FeNO values, where it was seen that FeNO is higher in children with atopy and allergic rhinitis when compared to non-atopic children, which can justify the facility for identify the true positive results in the test (LINHARES et al., 2011).

However, despite the higher values of sensitivity in atopic asthma, studies showed low positive likelihood ratio (LR +), which reduces the probability of the target disease being present (VET et al., 2008; WHITING et al., 2008). Among studies which presented LR + above five are Sivan et al. (2009), Sachs-Olsen et al. (2010) and Pérez Tarazona et al. (2011), all carried out in children with non-atopic asthma. The literature explains that different FeNO levels in asthmatic children reflect the different phenotypes of airway inflammation, because some atopic asthmatic subjects have predominantly neutrophilic inflammatory reaction, and how FeNO measurement just detect eosinophilic inflammatory reaction, resulting in lower FeNO values and therefore false negative cases (PIACENTINI et al., 2012; PRICE et al., 2013; LODGE et al., 2014). In fact, none of the studies provided information on pre-test probability for asthma diagnosis based on spirometry, assumed to be the gold standard for diagnosis of asthma, so the likelihood ratio values were not

adequately discussed in these articles, providing little insights as to the impact of spirometry on asthma diagnostic probability compared to FENO in their populations.

The specificity ranged from 38% to 94%, which reflects heterogeneous results between studies. This might be explained by the proportion of healthy individuals analyzed in each study, higher healthy frequency can result in greater estimated specificity. Based on the asthma prevalence value for each population it is possible to calculate the sample size representative of the disease, however, none of the studies mentioned such information, which could over and/or underestimate the number of healthy and asthmatic individuals (HOZO et al., 2005).

The best FeNO cut-off point that expressed the relation between sensitivity and specificity for non-atopic asthma diagnosis was seen on Perez Tarazona et al. (2011) study where reached LR + 7.2, LR- 0.10 and AUC 0.93 for FeNO \geq 19ppb. This value is consistent with the results reported in a systematic review by Feitosa et al. (2012), where the accurate FeNO value to diagnose exercise-induced bronchospasm was found in a cut-off point <20 ppb for children 5-16 years. The best accurate cut-off point for atopic asthma diagnosis was presented by Woo et al. (2012), where FeNO \geq 22 ppb reached LR + 4.8, LR-0.32 and AUC 0.85. This result supports the idea that atopy should be considered for clinical interpretation of FeNO measurements.

Despite the best sensitivity - specificity indicated in these studies, it is important to note that all articles included in this systematic review had high or uncertain bias risk for methodological criteria such as: blinding between tests, appropriate minimum time of tests execution and inclusion of all individuals in the statistical analysis. These criteria should be followed by researchers to ensure reliability and reproducibility of results obtained in diagnostic accuracy studies. Therefore, future studies with appropriate methodological rigor, based on Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy (STARD) guidelines (BOSSUYT et al., 2003), should be developed to summarize the FENO accuracy in childhood asthma diagnosis.

Meta-analysis

Studies that analyzed the diagnostic power of FeNO to regular asthma presented a lower odd-ratio (OR) of 0.40 (0.18, 0.89), which indicate a better chance to identify the non-asthmatic condition (Figure 6). In contrast, studies to atopic asthma presented a high OR of 2.68 (0.98, 7.36) in which FeNO has a better chance to indicate an asthmatic condition (Figure 7). It could be explained by higher excretion on eosinophilic inflammation by respiratory system in atopic asthma, which increases the probability to detect the true positive cases by FeNO measurement.

However, some characteristics were detected in this meta-analysis that reduces the consistency of these results, such as: extended diamond, short overlapping, and high heterogeneity index with p-value < 0.05. In addition, for comparison on FeNO in atopic asthma, there was also uncertainty of the results because p-value of the full effect was > 0.05, and the OR confidence interval exceeded the null line. Therefore, the results of this systematic review are heterogeneous probably by the low methodological criteria used, so the final result of meta-analyses can not be totally reliable.

Limitations of Systematic Review

The articles search was sufficiently broad and performed in five different databases. However, some articles may not be represented in these five databases. In addition, all articles were published in the last 10 years, so the possibility exists that some papers may have been accepted, pending publication and not yet reflected in the databases

CONCLUSION

FeNO is a simple and non-invasive method, which can contribute to asthma diagnosis in young children. Asthma can be considered in children 5-18 years old when FeNO values ≥ 19 ppb are found, and in atopic asthmatic subjects of the same age, when FeNO ≥ 22 ppb are found. Further studies are needed, with appropriate methodological rigor and samples based on sample size calculation, to standardize the ideal FeNO cut-off points for asthmatic children in different age subgroups.

REFERENCES

Abba A. Exhaled nitric oxide in diagnosis and management of respiratory diseases. *Ann Thorac Med.* 2009; 4(4):173–81.

American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS). Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171(8): 912–30.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. The STARD Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy: Explanation and Elaboration. *Ann Intern Med.* 2003; 138(1): 1–12.

De Vet HCW, Riphagen II, Eisinga A. Searching for Studies. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy.* 2008:1-60.

Feitosa LA, Dornelas de Andrade A, Reinaux CM, Britto MC. Diagnostic accuracy of exhaled nitric oxide in exercise-induced bronchospasm: Systematic review. *Rev Port Pneumol.* 2012; 18(4): 198–204.

Friedman T. Diagnosing asthma in young children: current research & recommendations. *J Pediatr Health Care.* 2010; 24(5): 305–11.

Grzelewski T, Witkowski K, Makandjou-Ola E, et al. Diagnostic value of lung function parameters and FeNO for asthma in schoolchildren in large, real-life population. *Pediatr Pulmonol.* 2014; 49(7): 632–40.

Hozo SP, Djulbegovic B, Hozo I. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. *BMC Med Res Methodol.* 2005; 20(5): 13.

Jang WN, Park IS, Choi CH, et al. Relationships between exhaled nitric oxide and atopy profiles in children with asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2013; 5(3): 155–61.

Jerzynska J, Majak P, Janas A, et al. Nitric Oxide Predictive value of fractional nitric oxide in asthma diagnosis-subgroup analyses. *Nitric Oxide.* 2014; 40: 87–91.

Linhares D, Jacinto T, Pereira AM, Fonseca JA. Effects of atopy and rhinitis on exhaled nitric oxide values - a systematic review. *Clin Transl Allergy.* 2011; 1(1): 1–7.

Lodge CJ, Zaloumis S, Lowe AJ, et al. Early-life risk factors for childhood wheeze phenotypes in a high-risk birth cohort. *J Pediatr.* 2014; 164(2): 289–94.

Manna A, Caffarelli C, Varini M, et al. Clinical application of exhaled nitric oxide measurement in pediatric lung diseases. *Ital J Pediatr.* 2012; 38: 74.

Olin JT, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. *BMJ*. 2014; 349.

Pérez Tarazona S, Martínez Camacho RM, Alfonso Diego J, Escolano Serrano S, Talens Gandía J. Diagnostic value of exhaled nitric oxide measurement in mild asthma. *An Pediatr (Barc)*. 2011; 75(5): 320–8.

Piacentini GL, Cattazzo E, Tezza G, Peroni DG. Exhaled nitric oxide in pediatrics: what is new for practice purposes and clinical research in children? *J Breath Res*. 2012; 6(2).

Prado OS, Pérez-Yarza EG, Ruiz AA, et al. Fraction of exhaled nitric oxide and asthma predictive index in infants less than two years-old. *Arch Bronconeumol*. 2011; 47(5): 234–8.

Price D, Ryan D, Burden A, et al. Using fractional exhaled nitric oxide (FeNO) to diagnose steroid-responsive disease and guide asthma management in routine care. *Clin Transl Allergy*. 2013; 3(1): 37.

Sachs-Olsen C, Lodrup Carlsen KC, Mowinckel P, et al. Diagnostic value of exhaled nitric oxide in childhood asthma and allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010; 21(1 Pt 2): 213–21.

Sivan Y, Gadish T, Fireman E, Soferman R. The use of exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma in school children. *J Pediatr*. 2009; 155(2): 211–6.

Van de Kant KD, Klaassen EM, Jöbsis Q, Nijhuis AJ, van Schayck OC, Dompeling EI. Early diagnosis of asthma in young children by using non-invasive biomarkers of airway inflammation and early lung function measurements: study protocol of a case-control study. *BMC Public Health*. 2009; 29(9): 210.

Whiting PF, Weswood ME, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PN, Kleijnen J. Evaluation of QUADAS, a tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *BMC Medical Research Methodology*. 2006/03/08 2006; Vol. 6:9.

Whiting P, Westwood M, Burke M, Sterne J, Glanville J. Systematic reviews of test accuracy should search a range of databases to identify primary studies. *J Clin Epidemiol*. 2008; 61: 357-364.

Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Annals of Internal Medicine* 2011; 155(8): 529–36.

Woo SI, Lee JH, Kim H, Kang JW, Sun YH, Hahn YS. Utility of fractional exhaled nitric oxide (FENO) measurements in diagnosing asthma. *Respir Med*. 2012; 106(8): 1103–9.

Yao TC, Ou LS, Lee WI, et al. Exhaled nitric oxide discriminates children with and without allergic sensitization in a population-based study. *Clin Exp Allergy*. 2011; 41(4): 556–64.

FIGURES AND TABLES

Figure 1: Study flow chart – PRISMA.

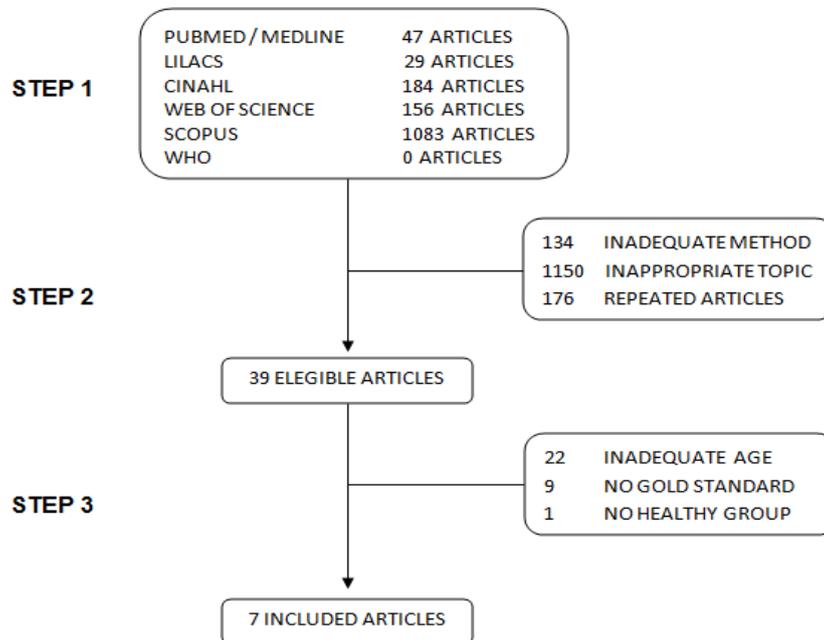


Figure 2: Bias risk criteria and applicability concerns of each study identified by the QUADAS tool.

	Risk of Bias				Applicability Concerns		
	Patient Selection	Index Test	Reference Standard	Flow and Timing	Patient Selection	Index Test	Reference Standard
GRZELEWSKI T et al, 2014	+	?	+	+	+	+	+
JERZYNSKA J et al, 2014	+	?	?	+	+	+	?
PÉREZ TS et al, 2011	?	?	?	-	+	+	+
SACHS-OLSEN C et al, 2010	?	-	?	?	+	-	+
SIVAN Y et al, 2009	?	+	+	?	-	+	+
WOO S-II et al, 2012	?	-	-	+	+	+	+
YAO TC et al, 2011	?	?	?	-	+	+	+

- High ? Unclear + Low

Figure 3 Overall bias risk and applicability concerns analysis determined by the QUADAS tool.

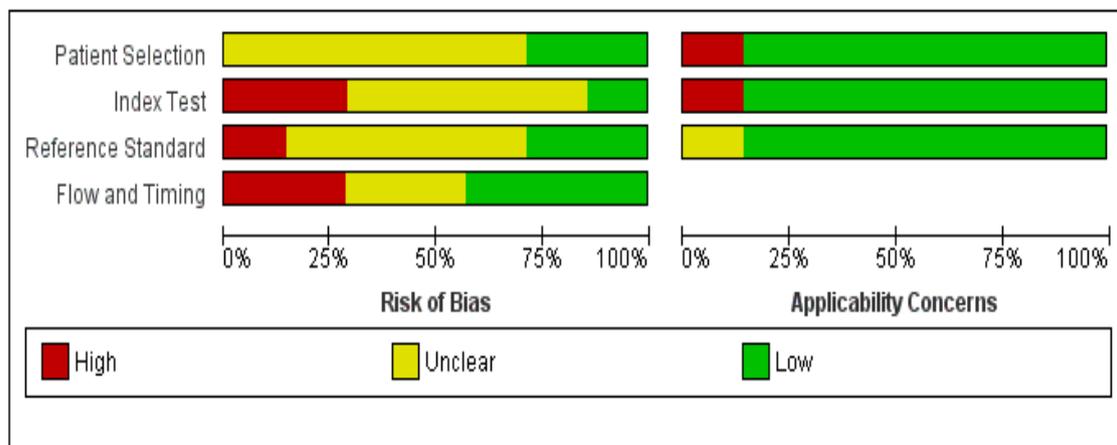


Figure 4: FeNO forest plot in diagnosis of non-atopic asthma.

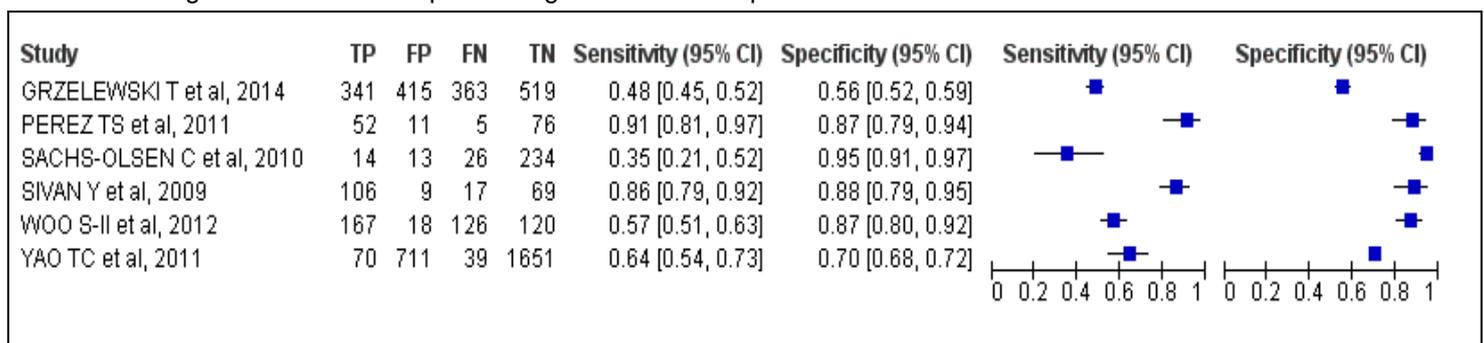


Figure 5: FeNO forest plot in diagnosis of atopic asthma.

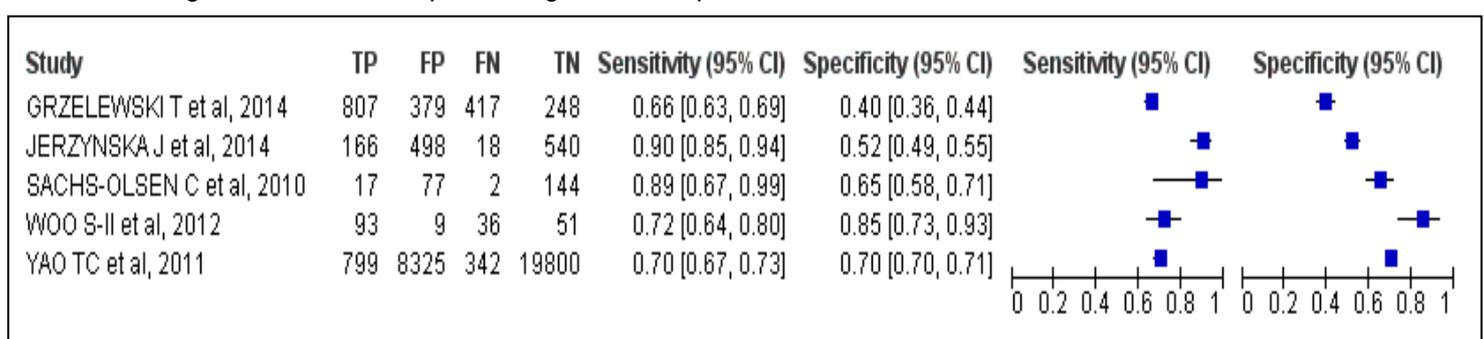


Figure 6: Forest plot of comparison: FeNO in asthma diagnosis. Outcome: Odds Ratio.

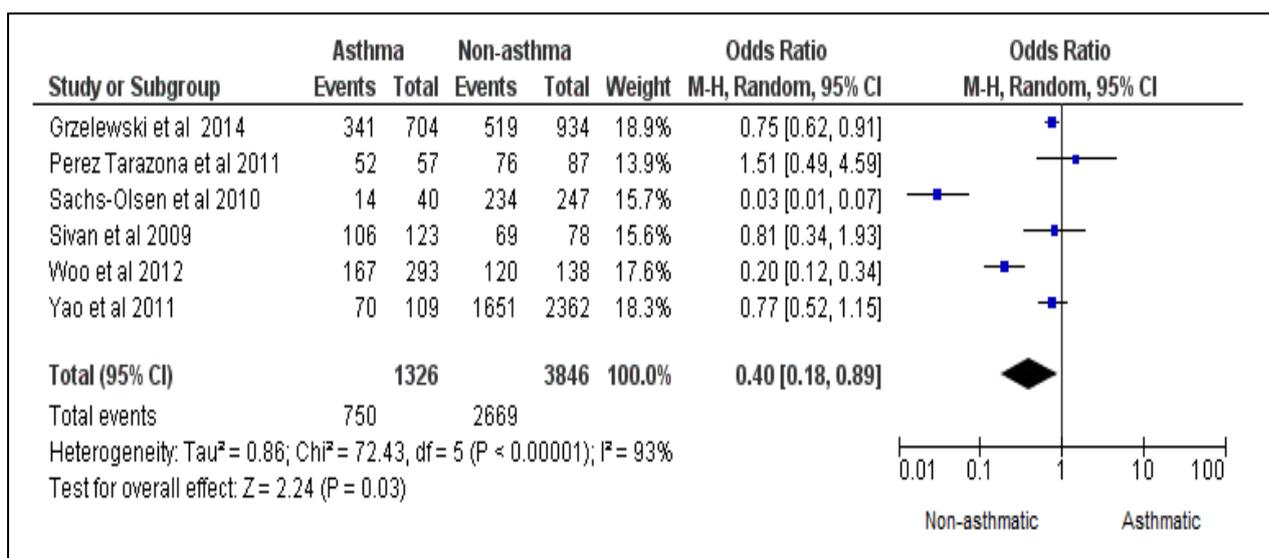


Figure 7: Forest plot of comparison: FeNO in atopic asthma diagnosis. Outcome: Odds Ratio.

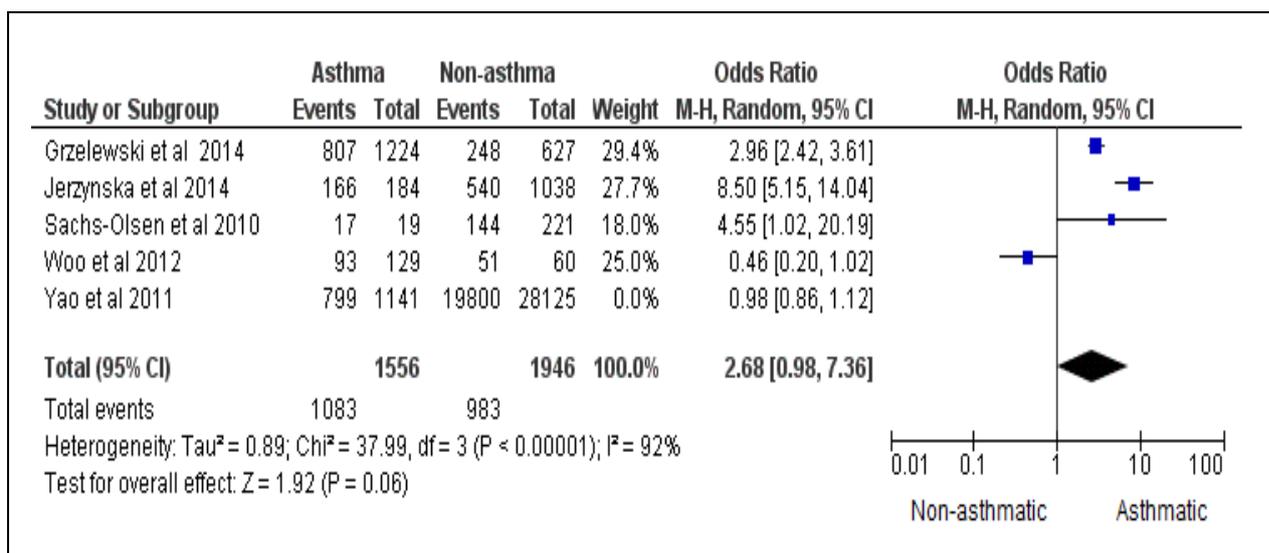


Table 1. Characteristics of selected studies used in this meta-analysis.

First Author Year Country	Inclusion criteria	Age (Min-max)	Male/Female (%)	Total Sample	Study design	Asthma Cases	Spirometry / Standard test	Nitric oxide measurement
(Grzelewski et al. 2014) Poland	Children with asthma either confirmed or excluded.	6-18	2180/1432 60.4%/39.6%	3612	Cross-sectional retrospective	2178 (60.3%)	Physical examination of the respiratory system. Spirometry (improvement in the pre-bronchodilator FEV ₁ ≥ 12% after the administration of salbutamol (200µg)).	Reference: ERS/ATS, 2001. Model: 280i nitric oxide analyzer, Sievers, Boulder, CO, USA. Flow: 50ml/s. Environment NO: ≤ 5ppb. Method: <i>on-line; single-breath</i> . Calibration: not reported.
(Jerzynska et al. 2014) Poland	Children with asthma either confirmed or excluded.	6-18	1048/719 59.3%/40.7%	1767	Cross-sectional retrospective	1054 (59.6%)	Physical examination of the respiratory system. Spirometry (improvement in the pre-bronchodilator FEV ₁ ≥ 12% after the administration of salbutamol (200µg)).	Reference: ERS/ATS, 2001. Model: 280i nitric oxide analyzer, Sievers, Boulder, CO, USA. Flow: 50ml/s. Environment NO: ≤ 5ppb. Method: <i>on-line; single-breath</i> . Calibration: not reported.
(Woo et al. 2012) Korea	Children with nonspecific respiratory symptoms suggestive of asthma.	8-16	163/82 67%/33%	245	Cross-sectional Prospective	167 (68.1%)	Relevant symptom history. Spirometry: reversible airflow obstruction (≥ 12% improvement in FEV ₁ in response to inhaled β ₂ -agonist) and/or airway hyperresponsiveness (methacholine PC ₂₀ ≤ 8 mg/ml).	Reference: ERS/ATS, 2005. Model: NIOX MINO; Aerocrine AB, Solna, Sweden. Flow: 50ml/s. Environment NO: not reported Method: <i>on-line; single-breath</i> . Calibration: not reported.
(Yao et al. 2011) Taiwan	Children from a public school (school-based sample) asthmatic or not.	5-18	807/844 48.9%/51.1%	1651	Cross-sectional	70 (4.3%)	Spirometry: forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 1s (FEV ₁) and forced expiratory flow (FEF ₂₅₋₇₅) were recorded. ISAAC: was defined ever having asthma and either the occurrence of wheeze in the last 12 months or current use of asthma medication.	Reference: ERS/ATS, 2005. Model: CLD 88sp NO analyzer, Eco Medics, Duernten, Switzerland. Flow: 50ml/s Environment NO: ≤ 5ppb Method: <i>on-line; single-breath</i> . Calibration: not reported.
(Pérez Tarazona et al. 2011) Spain	Asthmatic and non asthmatic children.	6-14	81/63 56.2%/43.8%	144	Cross-sectional Prospective	87 (60.4%)	Medical history. Spirometry: positive bronchodilator test.	Reference: ERS/ATS, 2005. Model: NIOX MINO; Aerocrine AB, Solna, Sweden. Flow: 50ml/s Environment NO: ≤ 5ppb Method: <i>on-line; single-breath</i> . Calibration: not reported.
(Sachs-Olsen et al. 2010) Norway	Children from a “Environment and Childhood Asthma” (ECA) study, asthmatic and non asthmatic.	10-12	176/155 53.1%/46.9%	331	Prospective Cohort	60 (18.1%)	ISAAC criteria Bronchial hyperresponsiveness (BHR): provocative inhaled dose of metacholine causing a 20% reduction in forced expiratory volume in 1 s (FEV ₁); PD ≤ 8µmol metacholine.	Reference: ERS/ATS, 2005. Model: EcoMedics Exhalizer CLD 88sp with DENOX 88 (ECO MEDICS AG, Duernten, Switzerland). Flow: 50ml/s Environment NO: not reported. Method: <i>on-line; single-breath</i> . Calibration: not reported.
(Sivan et al. 2009) Israel	Children with possible asthma.	5-18	84/66 56%/44%	150	Cross-sectional	106 (70.6%)	Patient’s history of 2 or more clinical exacerbations of wheezy; dyspnea or cough relieved by bronchodilators. Spirometry: FEV ₁ ≥ 15% in response to bronchodilators (inhalation of albuterol 400µg).	Reference: ERS/ATS, 2005. Model: Eco Physics CLD88, NO chemiluminescence analyzer; EcoMedics AC, Duernten, Switzerland. Flow: 50ml/s Environment NO: not reported. Method: <i>on-line; single-breath</i> . Calibration: not reported.

Table 2. Results of selected studies that were used for outcome analysis in this study (PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; LR+: positive likelihood ratio; LR-: negative likelihood ratio and AUC: area under ROC curve).

Authors /Year	Total sample	Asthma Cases	Cut off (PPB)	Sensitivity (95%CI)	Especificity (95%CI)	PPV %	NPV %	LR+	LR -	ROC CURVE (AUC)
Grzelewski et al 2014	3612	2178 (60.3%)	15.8	Asthma without Allergic rhinitis 53.04 % (48.19 % to 57.85 %)	Asthma without Allergic rhinitis 52.52 % (47.83 % to 57.17 %)	51.13% (46.37% to 55.87%)	54.42% (49.64 % to 59.14 %)	1.12 (0.98 to 1.27)	0.89 (0.78 to 1.02)	0.533 (IC not reported)
				Asthma with Allergic rhinitis 62.92 % (59.01 % to 66.70 %)	Asthma with Allergic rhinitis 38.81 % (32.94 % to 44.92 %)	70.77 % (66.81 % to 74.50 %)	30.77% (25.89 % to 35.99 %)	1.03 (0.92 to 1.15)	0.96 (0.80 to 1.15)	
				Asthma without Perennial allergens 37.74 % (30.18 % to 45.76 %)	Asthma without Perennial allergens 59.78 % (53.68 % to 65.67 %)	35.50 % (28.31 % to 43.22 %)	62.07 % (55.88 % to 67.98 %)	0.94 (0.73 to 1.20)	1.04 (0.89 to 1.22)	
				Asthma with Perennial allergens 70.00 % (64.56 % to 75.05 %)	Asthma with Perennial allergens 40.21 % (33.25 % to 47.47 %)	65.17 % (59.78 % to 70.28 %)	45.61 % (37.99 % to 53.39 %)	1.17 (1.02 to 1.34)	0.75 (0.59 to 0.95)	
				Asthma without Seasonal allergens 46.15 % (36.90 % to 55.61 %)	Asthma without Seasonal allergens 56.80 % (49.73 % to 63.66 %)	37.76 % (29.80 % to 46.25 %)	65.00 % (57.55 % to 71.95 %)	1.07 (0.83 to 1.37)	0.95 (0.77 to 1.16)	
				Asthma with Seasonal allergens 68.20 % (62.43 % to 73.58 %)	Asthma with Seasonal allergens 40.00 % (32.46 % to 47.90 %)	66.10 % (60.35 % to 71.51 %)	42.31 % (34.45 % to 50.46 %)	1.14 (0.98 to 1.32)	0.80 (0.62 to 1.02)	
Jerzynska et al 2014	1767	389 (84.5%)	23	90.22 % (68% to 98%)	52.02 % (42% to 61%)	25.00% (16% to 37%)	96.77 % (88% to 99%)	1.88 (1.74 to 2.04)	0.19 (0.12 to 0.29)	Not reported
Woo et al 2012	245	167 (68.1%)	22	Total study population 56.9% (51.11 % to 62.74 %)	Total study population 87.2% (80.17 % to 92.08 %)	90.5% (85.06 % to 94.13 %)	48.6% (42.38 % to 55.21 %)	4.44 (2.81 to 6.80)	0.49 (0.43 to 0.57)	0.76 (0.70 to 0.82)
		129 (68.2%)	22	Atopic subjects 72.09% (63.51 % to 79.63 %)	Atopic subjects 85.00% (73.42 % to 92.89 %)	91.2% (83.91 % to 95.88 %)	58.6% (47.55 % to 69.08 %)	4.80 (2.61 to 8.86)	0.32 (0.24 to 0.44)	0.85 (0.79 to 0.90)
Yao et al 2011	1651	70 (4.3%)	28	Asthma 64.3% (54.47 % to 73.17 %)	Asthma 69.9% (68.00 % to 71.74 %)	8.8% (7.05 % to 11.19 %)	97.7% (96.86 % to 98.35 %)	2.13 (1.83 to 2.49)	0.51 (0.40 to 0.66)	0.67 (0.60 to 0.74)
		799 (48.3%)	28	Allergic Asthma 70.0% (67.27 % to 72.67 %)	Allergic Asthma 70.4% (69.86 % to 70.93 %)	9.0% (8.18 % to 9.36 %)	98.3% (98.11 % to 98.48 %)	2.36 (2.27 to 2.47)	0.42 (0.39 to 0.47)	0.71 (0.64 to 0.79)
Pérez Tarazona et al 2011	144	87 (60.4%)	19	91.23 % (80.69 % to 97.06 %)	87.36 % (78.50 % to 93.51 %)	82.54 % (70.90 % to 90.94 %)	93.83 % (86.17 % to 97.94 %)	7.22 (4.13 to 12.61)	0.10 (0.04 to 0.23)	0.93 (0.88 to 0.97)
Sachs-Olsen et al 2010	331	17 (5.1%)	15.6	Current asthma 35.0% (23.0% to 50.0%)	Current asthma 94.0% (90.2% to 97.2%)	50.0% (33.0% to 67.0%)	90.0% (86.0% to 93.0%)	6.3 (3.38 to 13.09)	0.69 (0.55 to 0.86)	0.65 (0.59 to 0.71)
		14 (4.2%)	6.7	Current allergic asthma 88.0% (70.0% to 96.0%)	Current allergic asthma 65.0% (60.0% to 71.0%)	18.0% (12.0% to 26.0%)	99.0% (95.0% to 99.0%)	2.51 (2.03 to 3.26)	0.18 (0.04 to 0.60)	0.80 (0.73 to 0.85)
Sivan et al 2009	150	106 (70.6%)	19	86.0% (78.79 % to 91.73 %)	89.0% (79.22 % to 94.57 %)	92.0% (85.66 % to 96.35 %)	80.0% (70.25 % to 88.04 %)	7.81 (4.02 to 13.86)	0.15 (0.10 to 0.24)	0.90 (IC not reported)

Table 3. Quality of articles by QUADAS tool analysis. In italics: bias risk issues. In bold: applicability issues.

QUADAS	Grzelewski et al	Jerzynska et al	Woo et al	Yao et al	Pérez Tarazona et al	Sachs-Olsen et al	Sivan et al
<i>Was a consecutive or random sample of patients enrolled?</i>	Unclear	Unclear	Yes	Yes	Yes	Unclear	Yes
<i>Was a case-control design avoided?</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
<i>Did the study avoid inappropriate exclusions?</i>	Yes	Yes	Unclear	Unclear	Yes	Unclear	No
<i>Could the selection of patients have introduced bias?</i>	Low risk	Low risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk
Are there concerns that the included patients and setting do not match the review question?	Low concern	Low concern	Low concern	Low concern	Low concern	Low concern	High Concern
<i>Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard?</i>	Unclear	Unclear	No	Unclear	Unclear	Unclear	Yes
<i>If a threshold was used, was it pre-specified?</i>	No	No	No	No	No	Unclear	No
<i>Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?</i>	Unclear risk	Unclear risk	High risk	Unclear risk	Unclear risk	High risk	Low risk
Are there concerns that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?	Low concern	Low concern	Low concern	Low concern	Low concern	High concern	Low concern
<i>Is the reference standard likely to correctly classify the target condition?</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test?</i>	Unclear	Unclear	No	Unclear	Unclear	Unclear	Yes
<i>Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?</i>	Low risk	Unclear risk	High risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Low risk
Are there concerns that the target condition as defined by the reference standard does not match the question?	Low concern	Unclear concern	Low concern	Low concern	Low concern	Low concern	Low concern
<i>Was there an appropriate interval between index test and reference standard?</i>	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Yes	Yes
<i>Did all patients receive the same reference standard?</i>	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
<i>Were all patients included in the analysis?</i>	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No
<i>Could the patient flow have introduced bias?</i>	Low risk	Low risk	Low risk	High risk	High risk	Unclear risk	Unclear risk

APÊNDICE 2 – ARTICLE 2**CUT-OFF POINT OF FENO FOR WHEEZING DIAGNOSTIC IN
PRESCHOOL CHILDREN: A DIAGNOSTIC ACCURACY STUDY****To be submitted:****CHEST**

CUT-OFF POINT OF FENO FOR WHEEZING DIAGNOSTIC IN PRESCHOOL CHILDREN: A DIAGNOSTIC ACCURACY STUDY

Larissa Bouwman Sayão, MSc¹, Edjane Figueiredo Burity, MSc, PhD², Catarina Souza Rattes, MSc¹, Armèle Dornelas de Andrade, MSc, PhD¹, Murilo Carlos Amorim de Britto, MSc, PhD².

¹ Department of Physiotherapy, Federal University of Pernambuco, Brazil.

² Institute of Integral Medicine Fernando Figueira – IMIP, Brazil.

Corresponding author:

Armèle Dornelas de Andrade, MSc, PhD.

armeledornelas@yahoo.com

Federal University of Pernambuco

Department of Physical Therapy

Av. Jorn. Aníbal Fernandes, s/n. Cidade Universitária.

ZIP CODE: 50740-560 - Recife – PE (BRA)

Summary conflict of interest statements: There is no conflict of interest for all authors.

Funding information: It would not be possible to conduct this study without the financial support obtained from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and CAPES/PROCAD-NF (Grant no. 792/2009). Prof. Armèle Dornelas de Andrade was responsible for conducting this study.

Abbreviations List

ATS: American Thoracic Society

AUC: Area under curve

CI: Confidence interval

ERS: European Respiratory Society

FeNO: Fraction of Exhaled Nitric Oxide

LR: Likelihood ratio

PPB: Parts per billion

ROC curve: Receiver Operating Characteristics curve

ABSTRACT:

Background: Airways inflammation may precede pulmonary dysfunction in wheezing individuals. The fraction of exhaled nitric oxide (FeNO) has been described as a useful method for wheezing diagnosis in children, however, its application requires evidence. This study aimed to determine the accuracy of FeNO in identifying wheezing in preschoolers.

Methods: A cross-sectional study was carried out with children from 3-5 years old, from Brazilian day care centers and public schools. They were evaluated by FeNO measurement through the single breath method, and by ATS-DLD-78-C questionnaire that is used as a gold standard to phenotype wheezing patterns.

Results: The sample consisted of 243 non-wheezing children, 118 non-recurrent wheezing and 62 recurrent wheezing. The means of FeNO and confidence intervals of 95%, were 5.4 (CI 95%, 5.2-5.6); 7.5 (CI 95%, 6.9-8.2) and 11.2 (CI 95%, 9.6-12.7), respectively. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive FeNO values in the 6 parts per billion (ppb) cut-off point that best diagnosed wheezing of non-wheezing children, were: 65.5%, 84.3%, 75.6% and 76.7%, respectively, with an area under the curve (AUC)= 0.77. At 10 ppb, the best cut-off points for differentiating recurrent wheezing of non-recurrent wheezing were: 56.4%, 81.3%, 61.4%, 78.0%, respectively, with an AUC= 0.69. The post-test probability for each FeNO cut-off points was increased by 33% for wheezing and 20% for recurrent wheezing diagnosis when associated with clinical examination.

Conclusion: FeNO can provide a reliable and accurate method to discriminate the presence and type of wheezing in preschoolers with 92% of acceptable in this study population.

Keywords: Sensitivity and specificity; ROC curve; wheezy; exhaled nitric oxide; child.

INTRODUCTION

Wheezing is a common symptom in children in the early years of life. Among the most frequent reasons for its emergence are bronchiolitis and asthma. Whatever the cause, wheezing has an impact on quality of life and creates a high demand to seek medical care, especially when the episodes become recurrent.^{1, 2} Early identification of wheezing in young children provides the opportunity for both environmental and clinical intervention reducing the progression of inflammatory pulmonary disease.³

In preschool children the diagnosis of respiratory diseases is limited since some diagnoses are essentially clinical, for example presence of bronchiolitis and diagnostic tests such as spirometry with bronchodilator reversibility and bronchial provocation are prone to problems of cooperation, execution and reproducibility in preschool children.^{4, 5, 6} Additionally, studies show that children with wheezing or mild to moderate asthma often have normal baseline values of forced expiratory volume in the first second (FEV₁).⁷⁻¹⁰

The inflammatory process of the respiratory tract may be present in wheezing children even before the pulmonary function impairment is diagnosed, because episodes of recurrent wheezing determine the release of eosinophilic mediators and inflammatory biomarkers, including, nitric oxide (NO).¹¹⁻¹³ For this reason, the measurement of the fraction of exhaled nitric oxide (FeNO) has been investigated as a useful tool in the diagnosis and monitoring of respiratory tract inflammation, especially in populations in which other pulmonary function tests are not easily applied.^{11, 14, 15}

Studies have been shown a direct relationship between high levels of FeNO and recurrent wheezing in preschool children, and therefore, have been used to identify an increased risk of asthma at school-age. However, although the FeNO measurements can provide positive perspectives for the pulmonary monitoring of this population, the interpretation of FeNO values should be further clarified in the different types of wheezing.¹⁶⁻¹⁸

Studies have adopted heterogeneous criteria for the classification of wheezing, and consequently, different FeNO values have been found, resulting in conflicting information as to the determination of an optimal FeNO cut-off which adequately differentiates the wheezing phenotypes.¹⁵⁻¹⁸ We hypothesized that the FeNO measurement is accurate to identify wheezing and non-wheezing

preschool and differentiate recurrent and non-recurrent wheezing. The aim of this study, therefore, was to evaluate and establish a diagnostic FeNO value for wheezing in preschool children compared with information from a validated questionnaire.

METHOD

Study sample

Based on the best sensitivity and specificity values of a pilot study with 50 volunteers, we calculated from a confidence level of 95% and a maximum permissible error of 5%, a total sample size of 423 preschool children.¹⁹ Volunteers were recruited from 18 day care centers and/or public schools in the city of Recife, Pernambuco, BR, chosen at random, during the period from March to December 2014. All children were present during the data collection period, aged between 3 and 5 years old, wheezing or not. Those with specific diseases such as bronchopulmonary dysplasia, cystic fibrosis, tuberculosis, current respiratory tract infection, acute wheezing, neurological or genetic disease with clinical consequences, and the ones who failed to execute the FeNO maneuver were excluded. All parents or caregivers of the participants signed a letter of informed consent and the study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco, Brazil, under the protocol number CAAE – 21377513.5.0000.5208.

Study design

A cross-sectional population-based study was conducted in the school environment. Parents or caregivers of the children answered a questionnaire based in American Thoracic Society and Division of Lung Diseases for children questionnaire (ATS-DLD-78–C).²⁰ Participants were classified into three groups: (1) non-wheezing (children who did not have episodes of wheezing in the last 6 months); (2) non-recurrent wheezing (children who presented 1 to 3 episodes of wheezing in the last 6 months); and (3) recurrent wheezing (children who had more than 3 episodes of wheezing in the last 6 months).²¹ Through the questionnaire, gestational age, birth weight, exposure to passive smoking, atopy, and breastfeeding were also evaluated. All interviews were conducted by

2 researchers who were trained about how to approach the parents of study participants.

In the school, each subject's weight was measured with a digital scale accurate to 100 grams (Magna, São Paulo, Brazil) and height was measured with a stadiometer (Cardiomed, São Paulo, Brazil) accurate to 1 mm.

Measurement of the fraction of exhaled nitric oxide (FeNO)

FeNO was measured by chemiluminescence through the online single breath method, using a portable analyzer (NIOX-MINO, Aerocrine, Sweden), according to the guidelines of the American Thoracic Society / European Respiratory Society²² and expressed in parts per billion (ppb). The children were placed sitting comfortably without nose clip, instructed to inhale the ambient air with nitric oxide removed through a mouthpiece, to approximately total lung capacity, and then, performing exhalation with constant flow rate of 50 ml/s for at least 6 seconds. Children who were not successful in performing the maneuver after up to 10 test attempts were excluded.

All evaluations were performed by the same operator, at the subject's school, in a quiet isolated environment, and at the same time of day (morning) thus preventing exposure of the volunteer to extrinsic factors for at least 1 hour before the test, such as: smoke, strenuous physical exercise, nutrition and medication use. The operator was not blind to the wheezing rating from the scale.

Statistical analysis

The analysis was performed using SPSS® 20.0 software (Chicago, USA). The mean values for FeNO of the three groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test. For categorical variables, we used the Pearson's chi-square test. Data were expressed as mean \pm standard deviation and frequency. Significance was determined by $p < 0.05$.

The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), likelihood ratio (LR), Youden's index and Receiver Operating Characteristics (ROC) curve were calculated using MedCalc 15.0 software (Ostend, Belgium).

RESULTS

From 489 eligible children, 66 were excluded. Among those, 35 were unable to perform the maneuver (Figure 1). The sample was then composed of 243 non-wheezing (NW), 118 non-recurrent wheezing (NRW) and 62 recurrent wheezing (RW) classified by questionnaire information. The FeNO values in the groups were 5.4 ppb (CI 95%, 5.2-5.6) for NW; 7.5 ppb (CI 95%, 6.9-8.2) for NRW; and 11.2 ppb (CI 95%, 9.6-12.7) for RW, ($p < 0.001$). Atopy, passive smoking, low weight and oxygen therapy at birth were significantly higher for the groups of wheezing ($p < 0.01$). The characteristics of the participants are presented in Table 1.

Accuracy of FeNO for the diagnosis of wheezing (non-recurrent and recurrent wheezing compared to non-wheezing)

The sensitivity and specificity values, PPV, NPV and Youden index for each cut-off point are listed in Table 2. As shown in Figure 2, the ROC curve with best relationship between sensitivity and specificity determined a value of 6 ppb of FeNO, with 65.5% (CI 95%, 58,1-72,4) sensitivity and 84.3% (CI 95%, 79,1- 88,6) specificity, with the area under the curve (AUC) of 0.77 (CI 95%, 0.72-0.82 and $p < 0.000$). Given the prevalence of wheezing in the study of 43%, a FeNO value higher or equal to 6 ppb showed a wheezing PPV of 75,6% (CI 95%, 68,1-82,1) and the NPV was 76,7% (CI 95%, 71,2-81,7).

Accuracy of FeNO for the diagnosis of recurrent wheezing (compared to non-wheezing)

The results for each cut-off are listed in Table 3. Between these two groups (RW and NRW), the accuracy of FeNO was lower. The best ROC curve was found at the cut-off point of 10 ppb, with a sensitivity of 56.4% (CI 95% 43,2- 69,0), specificity of 81.3% (CI 95%, 73,1- 87,9) and AUC of 0.69 (CI 95%, 0.60-0.77), $p < 0.000$ (Figure 2). For a recurrent wheezing frequency of 15%, the PPV was 61,4% (CI 95%, 47,5-74,0) and the NPV 78% (CI 95%, 69,6-85,0).

Likelihood ratio (LR)

Likelihood ratios are typically used in to assessing the clinical value of performing a diagnostic test. They incorporate sensitivity and specificity of the

test to determine whether a test result changes the probability that a condition exists facing a pre-test probability known for gold standard information. Youden's index is suggested as a way of summarizing the performance of a diagnostic test. Its value ranges from 0 to 1, when zero value, the diagnostic test gives the same proportion of positive results for groups with and without the disease, the test is useless. When 1, indicates that there are no false positives or false negatives, therefore, the test is perfect.

The LR + to 6 ppb cut-off point was 4.19 (CI 95%, 3.07-5.72) and the LR- was 0.41 (CI 95%, 0.33-0.50). According to the prevalence observed in the study, the pretest probability for wheezing was 43%. Using the nomogram for LR+ was observed that the children presenting FeNO greater than or equal to 6 ppb obtained a post-test probability of 76% to have wheezing. In contrast, those who have not reached the cut-off point, showed post-test probability of only 23%. As for the 10 ppb cut-off point, a LR+ of 3.03 (CI 95%, 1.96-4.68) and LR- of 0.54 (CI 95%, 0.40-0.72) was observed. The pretest probability for recurrent wheezing was 15%. According to the values obtained by the nomogram, children who have reached or exceeded this cut-off point, showed 35% post-test probability of developing recurrent wheezing. While the children who have not reached the FeNO value of 10 ppb, presented post-test probability of 9% (Figure 3).

DISCUSSION

This is the first reported study in Brazilian preschool children to determine the accuracy of FeNO in the diagnosis of recurrent and non-recurrent wheezing. First, this is a method of easy execution in preschoolers, the high percentage of acceptable measurements in this study was higher than the Malmberg et al.²³ in Finnish preschoolers and the Caudri et al in Dutch children of four years old.²⁴

Our results demonstrate that FeNO can be a reliable early diagnostic tool to identify and differentiate wheezing and recurrent wheezing in preschool children. Our found cut-off points are consistent with the literature.²⁵⁻²⁸ With respect to the cut-off point for recurrent wheezing, our results are consistent with the case-control of Malmberg et al²³ with Finnish preschoolers, which using the same unique breathing technique, the cut-off point to differentiate persistent

wheezing / recurrent of chronic cough and from healthy children was 9.7ppb. Two studies that did not determine the cut-off point for wheezing, but differences between the central and dispersion measurements among groups also show results consistent with those observed in our population. In a cut-off with children under four years old in Switzerland, the mean of FeNO in the wheezing with a low probability of asthma was 6.4 ppb, and in the wheezing with high probability of asthma was 11.6 ppb.²⁵ In a study with Korean preschoolers, those transient wheezing had a mean FeNO value of 11.5 ppb and 14.4 ppb for persistent wheezing.²⁷

We might note, therefore, that our limits of FeNO values were similar to described in the literature, however in those studies there was no diagnostic validation, therefore our finding could reinforce previous results and offer an accuracy information too.

By the findings of this study, FeNO improves the diagnostic accuracy of wheezing when associated with clinical examination by the increase of the post-test probability. The same is true for the diagnosis of recurrent wheezing. There is biological plausibility for this. First, nitric oxide excretion by respiratory system is dependent on eosinophilic inflammation, a characteristic of asthma.²⁹ Also being the preschooler wheezing from multifactorial nature, occupying the atopic asthma a less important space in this group than in older individuals admits that the test is most useful in younger children, where the lung function tests and allergy tests are less helpful.^{23, 30, 31}

In a parallel study of the same population of 423 preschool children, spirometry was attempted with only about 50% success (Burity, et al., in press). In contrast, 92% of the children demonstrated successful maneuver with FeNO. This suggests that the FeNO maneuver is easy to perform in 3 – 5 year old children. Unlike spirometry, FeNO is a good candidate for identify children with probable development of wheezing prior to manifestation of symptoms required for a clinical diagnosis of asthma.

In this context of the possibility of identification of wheezing in preschool children can allows early intervention possible reducing future costs such as doctors visits, unscheduled clinic and emergency visits, hospitalization, lost days of school as well mortality. Despite the initial costs for the acquisition of FeNO portable device (\$4,000 US) and Sensors (\$1,500/ 300 tests) the cost for

mass screening of preschool children would be as low as \$6.00/test. This represents a small investment per child to offset the much greater savings through early identification and intervention. Therefore, further studies should be developed to determine whether FeNO screening associated to early environment and clinical interventions would reduce the progress and cost of pulmonary disease as children get older.

Strength and limitations of the study

A favorable aspect of this study was the sample, it has been sourced from child care centers and schools, which characterizes as a population based, and has had an enough number of participants so that the subgroups were not small. In addition, the study was designed according to the guidelines of the Standards of Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD).³² Although no mask was used in between tests, the results of FeNO are determined objectively and it is believed that subjects did not experience a learning effect or interference from the examiner, additionally, all measurements were systematically performed after the gold standard. The reference standard for determination of wheezing was the questionnaire ATS-DLD-78-C, recommended by the Epidemiology Standardization Projects, validated in Brazil for children under 13 years old.²¹

Another positive aspect relates to the study design. How the objective of our study was evaluate FeNO performance, a cross-sectional design is more indicated method. Differently when the objective is screening the test, the cohort study is indicated because can confirm the wheezing phenotypes through evaluation when children become older, for allergy tests and bronchial provocation.

On the other hand, some limitations have occurred. According to Cane et al³³, parents / caregivers of English children from 5 months to 16 years old do not accurately define wheezing by written questionnaire when compared to video questionnaire. This study did not use video questionnaire because was chosen the most common mode of inquiry. This, in a certain way, increased the usefulness of FeNO, which potentially reduced the selection bias.

In conclusion, measurement of FeNO can be considered as a reliable tool to identify and differentiate wheezing and recurrent wheezing in

preschoolers, using cut-off points of 6 ppb for wheezing and 10 ppb for recurrent wheezing. It is an easy measurement and well tolerated by children. However, studies of different genetic and broader socio-demographic populations are needed to confirm these findings.

ACKNOWLEDGMENTS

Author contributions: *Sayão* had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. *Sayão*: contributed to the study concept and design, data analysis and interpretation; drafting of the manuscript, writing of the manuscript; and important intellectual input to and approval of the final manuscript. *Dra Andrade*: contributed to the study concept and design, data analysis and interpretation, drafting and revision of the manuscript; and important intellectual input to and approval of the final manuscript. *Dra Burity*: contributed to the study concept, data interpretation, and revision of the manuscript. *Rattes*: contributed to the study concept, data interpretation, statistic analyses and revision of the manuscript. *Dr Britto*: contributed to the study concept and design, data analysis and interpretation, writing of the manuscript; and important intellectual input to and approval of the final manuscript.

Financial/nonfinancial disclosures: The authors have reported to *CHEST* that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article.

Role of sponsors: The sponsor had no role in the design of the study, the collection and analysis of the data, or in the preparation of the manuscript.

Other contributions: The study was conducted by the Federal University of Pernambuco in collaboration with the Municipal Health Pediatric Service – IMIP and Education Secretary of Recife city, Brazil. We thank too the children and parents for their contributions to this study.

REFERENCES

1. Bacharier L. B. Evaluation of the child with recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(3): 690–690.
2. Bhatt J, Smyth A. The Management of Pre-School Wheeze. *Paediatr Respir Rev.* 2011;12(1): 70–77.
3. Hovland V, Riiser A, Mowinckel P, Carlsen K. The significance of early recurrent wheeze for asthma outcomes in late childhood. *Eur Respir J* 2013;41(4): 838–845.
4. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, Alverson BK, Baley JE, et al. Clinical Practice Guideline: The Diagnosis, Management, and Prevention of Bronchiolitis. *Pediatrics.* 2014; 134: 1474-1502.
5. Rosenfeld M, Allen J, Arets B, et al. An official American Thoracic Society workshop report: Optimal lung function tests for monitoring cystic fibrosis, bronchopulmonary dysplasia, and recurrent wheezing in children less than 6 years of age. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2013;10: 1–11.
6. Borrego L, Couto M, Almeida I, Morais-almeida M. Espirometria em idade pré-escolar na prática clínica. *Rev Port Imunoalergologia.* 2012;20: 23–31.
7. Friedman, T. Diagnosing asthma in young children: current research & recommendations. *J Pediatr Health Care.* 2010;24(5):305–311.
8. Kerkhof M, Boezen H, Granell R, et al. Transient early wheeze and lung function in early childhood associated with chronic obstructive pulmonary disease genes. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:68–76.
9. Lowe A, Simpson A, Woodcock A, et al. Wheeze phenotypes and lung function in preschool children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(20):231–237.
10. Sonnappa S, Bastardo C, Wade A, et al. Symptom-pattern phenotype and pulmonary function in preschool wheezers. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(3):519–526.
11. Abba, A. A. Exhaled nitric oxide in diagnosis and management of respiratory diseases. *Ann Thorac Med.* 2009;4(4):173-181.
12. Manna A, Caffarelli C, Varini M, et al. Clinical application of exhaled nitric oxide measurement in pediatric lung diseases. *Ital J Pediatr.* 2012; 38.
13. Kant K, Jansen M, Klaassen E, et al. Elevated inflammatory markers at preschool age precede persistent wheezing at school age. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012;23(4):259–264.

14. Kant K, Klaassen E, Jöbsis Q, et al. Early diagnosis of asthma in young children by using non-invasive biomarkers of airway inflammation and early lung function measurements: study protocol of a case-control study. *BMC Public Health*. 2009; 9.
15. Peña Zarza J, Osona B, Gil-sanchez J, Figuerola J. Exhaled Nitric Oxide in Acute Phase of Bronchiolitis and Its Relation with Episodes of Subsequent Wheezing in Children of Preschool Age. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 2012;25(2):92–96.
16. Olin A.-C, Rosengren A, Thelle D, Lissner L, Torén K. Increased fraction of exhaled nitric oxide predicts new-onset wheeze in a general population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):324–327.
17. Prado O, Pérez-Yarza E, Ruiz A, et al. Fraction of exhaled nitric oxide and asthma predictive index in infants less than two years-old. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(5):234–238.
18. Singer F, Luchsinger I, Inci D, et al. Exhaled nitric oxide in symptomatic children at preschool age predicts later asthma. *Allergy*. 2013;68(4):531–538.
19. Kelsey JL. *Methods in observational epidemiology*, 2nd ed. Oxford University Press, New York, NY, 1996.
20. Esteves AZ. Adaptação e validação do questionário ATS-DLD-78-C, para diagnóstico de asma em crianças com até 13 anos. [Dissertação]. 1995. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo.
21. Dela Bianca A, Wandalsen G, Solé D. Wheezing infant : prevalence and risk factors. *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol*. 2010;33(2): 43–50.
22. American Thoracic Society/European Respiratory Society. Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171: 912–930.
23. Malmberg L, Pelkonen A, Haahtela T, Turpeinen M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax*. 2003;58:494–499.
24. Caudri D, Wijga AH, Hoekstra MO, et al. Prediction of asthma in symptomatic preschool children using exhaled nitric oxide, Rint and specific IgE. *Thorax*. 2010;65:801-807.
25. Moeller A, Diefenbacher C, Lehmann A, et al. Exhaled nitric oxide distinguishes between subgroups of preschool children with respiratory symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(3):705–709.
26. Malby Schoos AM, Chawes BL, Bonnelykke K, Bisgaard H. Fraction of exhaled nitric oxide and bronchial responsiveness are associated and

- continuous traits in young children independent of asthma. *Chest*. 2012;142:1562–1568.
27. Oh M-A, Shim JY, Jung Y-H, et al. Fraction of exhaled nitric oxide and wheezing phenotypes in preschool children. *Pediatr Pulmonol*. 2013; 48(6): 563-570.
28. Elliott M, Heltshe SL, Stamey DC, Cochrane ES, Redding GJ, Debley JS. Exhaled nitric oxide predicts persistence of wheezing, exacerbations, and decline in lung function in wheezy infants and toddlers. *Clin Exp Allergy*. 2013;43:1351-1361.
29. Dodig S, Richter D, Zrinski-Topic R: Inflammatory markers in childhood asthma. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49:587–599.
30. Shim JY. Association of wheezing phenotypes with fractional exhaled nitric oxide in children. *Korean J Pediatr*. 2014; 57:211-216.
31. Depner M, Fuchs O, Genuneit J, et al. Clinical and Epidemiologic Phenotypes of Childhood Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:129-138.
32. Bossuyt P, Reitsma J, Bruns D, et al. The STARD Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy : Explanation and Elaboration. *Ann Intern Med*. 2003;138:1–12.
33. Cane RS, Ranganathan SC, McKenzie SA. What do parents of wheezy children understand by “wheeze”? *Arch Dis Child*. 2000; 82:327–332.

TABLES

Table 1 – Baseline characteristics of study participants in each group.

	Non-wheezing (n=243)	Non-recurrent wheezing (n=118)	Recurrent wheezing (n=62)	P - value
Age (months)	58,4±7,6	58,1±8,2	57,0±9,1	NS
Male sex	126 (51,9%)	62 (52,5%)	27 (43,5%)	NS
Weight (Kg)	18,9±3,8	18,5±2,9	19,0±5,3	NS
Height (cm)	106,8±6,8	105,8±6,1	105,7±6,8	NS
Exclusive breastfeeding (months)	5,0±4,3	4,7±4,8	5,1±6,9	NS
Gestational age (<37weeks)	28 (11,5%)	17 (14,4%)	10 (16,1%)	NS
Birth weight (<2500g)	17 (7%)	13 (11%)	10 (16,1%)	0,02*
O2 use at birth	15 (6,2%)	16 (13,6%)	14 (22,6%)	<0,0001*
Passive smoking	124 (51%)	77 (65,3%)	37 (59,7%)	0,03*
Atopy	171 (70,4%)	103 (87,3%)	55 (88,7%)	<0,0001*
FeNO (ppb)	5,4±1,3	7,5±3,6	11,2±5,9	<0,0001†

Abbreviations: n= number of individuals; FeNO= exhaled nitric oxide fraction; ppb= parts per billion; NS=not significant. Data are expressed by mean ± SD and frequency (%). *Qui-quadrado test; †ANOVA

Table 2 – Cut-off points of FeNO to wheezing diagnosis.

FeNO (ppb)	Sensitivity %	Especificity %	PPV%	NPV%	LR+	LR-	<i>Youden Index</i>
≥ 6	65,56 (CI: 58.12 to 72.47)	84,36 (CI: 79.17 to 88.69)	75,64 (CI: 68.13 to 82.15)	76,78 (CI: 71.24 to 81.71)	4.19 (CI: 3.07 to 5.72)	0.41(CI: 0.33 to 0.50)	0,49
≥ 7	54,44 (CI: 46.87 to 61.87)	90,95(CI: 86.95 to 93.16)	81,67 (CI: 73.57 to 88.14)	72,94 (CI: 67.56 to 77.86)	6.01 (CI: 3.95 to 9.16)	0.50(CI: 0.42 to 0.59)	0,45
≥ 8	49,44 (CI: 41.93 to 56.98)	93,42 (CI: 89.53 to 96.19)	84,76 (CI: 76.43 to 91.03)	71,38 (CI: 66.08 to 76.29)	7.51 (CI: 4.57 to 12.33)	0.54(CI: 0.47 to 0.63)	0,42
≥ 9	40,00 (CI: 32.78 to 47.55)	95,88 (CI: 92.56 to 98.01)	87,80 (CI: 78.71 to 93.98)	68,33 (CI: 63.10 to 73.23)	9.72 (CI: 5.16 to 8.30)	0.63(CI: 0.55 to 0.71)	0,35
≥ 10	31,67 (CI: 24.95 to 39.00)	96,71 (CI: 93.61 to 98.56)	87,69 (CI: 77.17 to 94.52)	65,64 (CI: 60.47 to 70.55)	9.62 (CI: 4.71 to 19.65)	0.71(CI: 0.64 to 0.78)	0,28

Abbreviations: PPV= positive predictive value; NPV= negative predictive value.

Table 3 – Cut-off points of FeNO to recurrent wheezing diagnosis.

FeNO (ppb)	Sensitivity %	Especificity %	PPV%	NPV%	LR+	LR-	<i>Youden Index</i>
≥ 6	74,19 (CI: 61.50 to 84.47)	38,98 (CI: 30.14 to 48.39)	38,98 (CI: 30.14 to 48.39)	74,19(CI: 61.50 to 84.47)	1.22 (CI: 0.99 to 1.49)	0.66 (CI: 0.41 to 1.07)	0,13
≥ 7	70,97 (CI: 58.05 to 81.79)	54,24 (CI: 44.82 to 63.44)	44,90 (CI: 34.83 to 55.28)	78,05(CI: 67.54 to 86.44)	1.55 (CI: 1.20 to 2.00)	0.54 (CI: 0.35 to 0.82)	0,25
≥ 8	69,35 (CI: 56.35 to 80.43)	61,02 (CI: 51.61 to 69.86)	48,31 (CI: 37.59 to 59.16)	79,12(CI: 69.33 to 86.93)	1.78 (CI: 1.34 to 2.35)	0.50 (CI: 0.34 to 0.75)	0,30
≥ 9	62,90 (CI: 49.69 to 74.83)	72,03 (CI: 63.02 to 79.90)	54,17 (CI: 42.01 to 65.97)	78,70(CI: 69.78 to 85.99)	2.25 (CI: 1.59 to 3.18)	0.51 (CI: 0.37 to 0.73)	0,34
≥ 10	56,45 (CI: 43.26 to 69.01)	81,36 (CI: 73.14 to 87.93)	61,40 (CI: 47.58 to 74.00)	78,05(CI: 69.69 to 85.01)	3.03 (CI: 1.96 to 4.68)	0.54 (CI: 0.40 to 0.72)	0,37
≥ 11	46,77 (CI: 33.99 to 59.88)	83,05 (CI: 75.04 to 89.33)	59,18 (CI: 44.21 to 73.00)	74,81(CI: 66.48 to 81.98)	2.76 (CI: 1.71 to 4.46)	0.64 (CI: 0.50 to 0.82)	0,29
≥ 12	43,55 (CI: 30.99 to 56.74)	87,29 (CI: 79.90 to 92.70)	64,29 (CI: 48.03 to 78.44)	74,64(CI: 66.53 to 81.65)	3.43 (CI: 1.97 to 5.95)	0.65 (CI: 0.51 to 0.81)	0,30
≥ 13	35,48 (CI: 23.75 to 48.66)	89,83 (CI: 82.91 to 94.63)	64,71 (CI: 46.49 to 80.24)	72,60(CI: 64.61 to 79.65)	3.49 (CI: 1.85 to 6.57)	0.72 (CI: 0.59 to 0.87)	0,24
≥ 14	32,26 (CI: 20.94 to 45.34)	93,22 (CI: 87.07 to 97.02)	71,43 (CI: 51.33 to 86.74)	72,37(CI: 64.54 to 79.30)	4.76 (CI: 2.22 to 10.18)	0.73 (CI: 0.61 to 0.87)	0,25
≥ 15	27,42 (CI: 16.86 to 40.23)	95,76 (CI: 90.38 to 98.59)	77,27 (CI: 54.62 to 92.09)	71,52(CI: 63.80 to 78.41)	6.47 (CI: 2.51 to 16.71)	0.76 (CI: 0.65 to 0.89)	0,23

Abbreviations: PPV= positive predictive value; NPV= negative predictive value.

FIGURES

Figure 1: Flow chart of participant selection according to STARD.

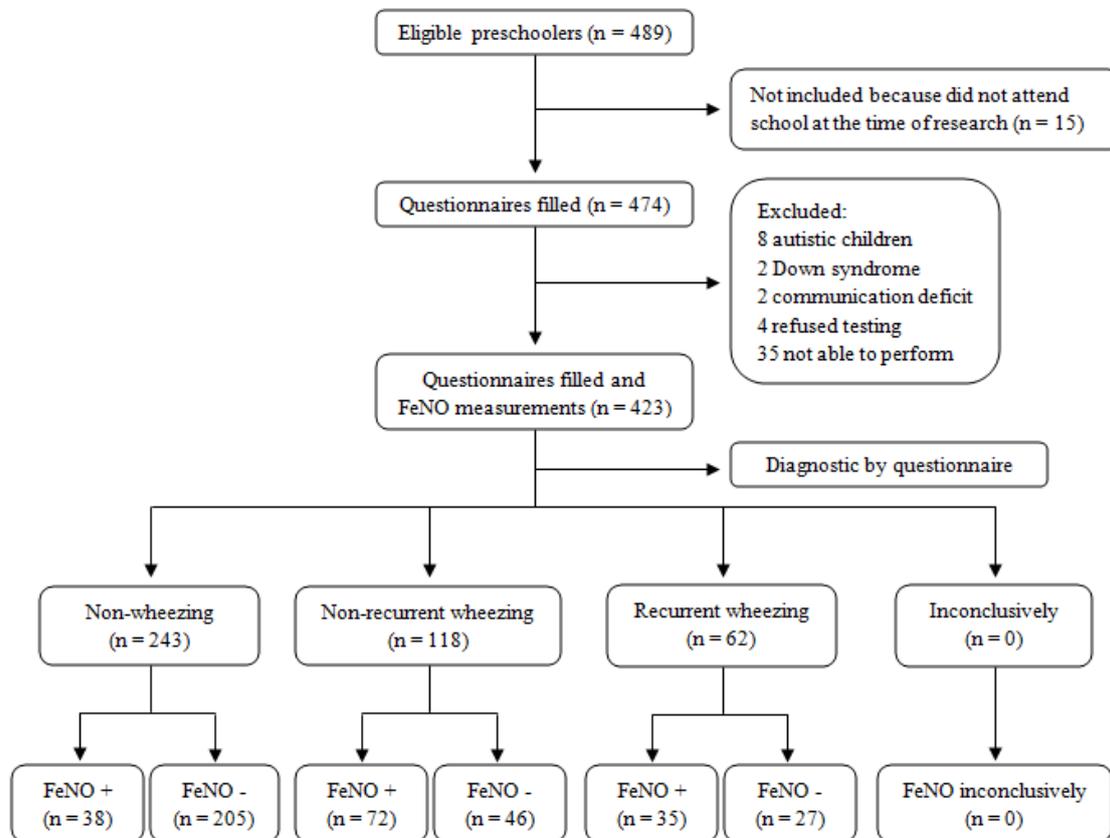


Figure 2: ROC curves analyses estimated optimal cut-off point of FeNO. A: FeNO for wheezing diagnosis (6ppb [AUC, 0.77; CI: 0.72-0.82]) and B: FeNO for recurrent wheezing diagnosis (10ppb [AUC, 0.69; CI: 0.60-0.77]) in preschool children.

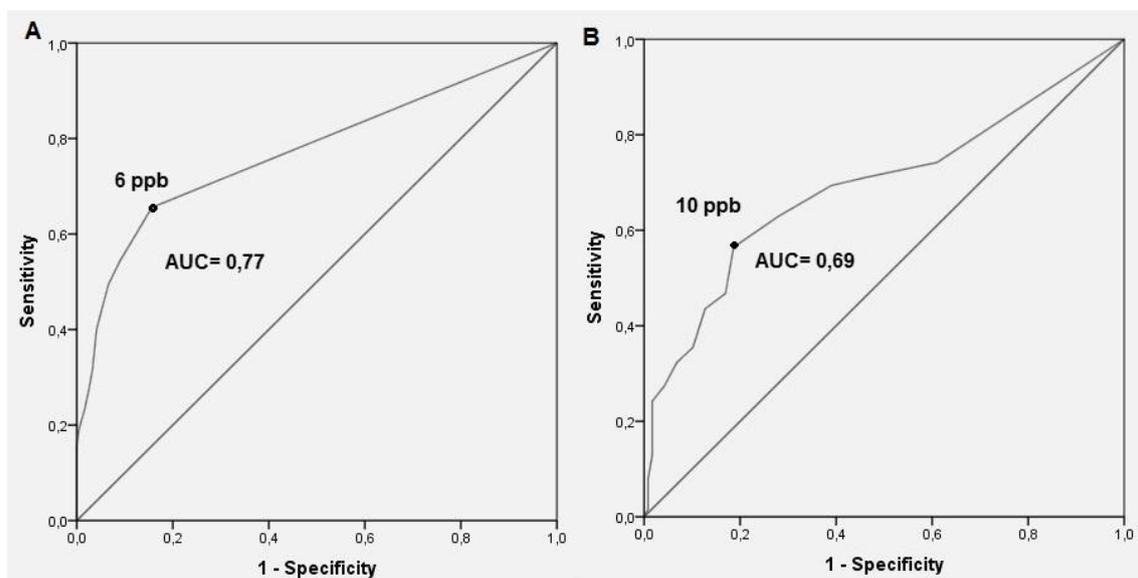
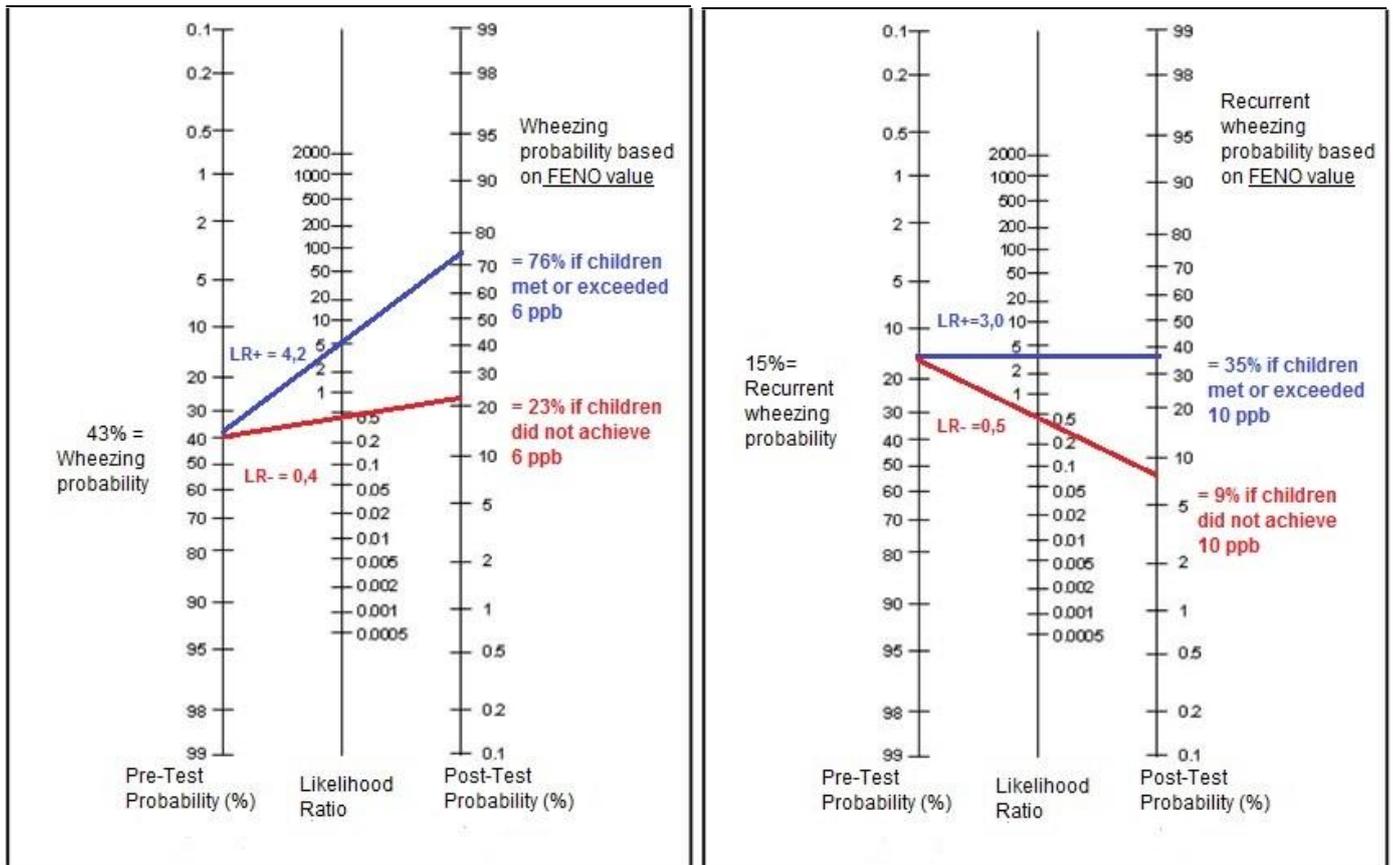


Figure 3: Nomograms of probability diagnostic for wheezing and recurrent wheezing.



APÊNDICE 3 – ARTICLE 3

**AIRWAY INFLAMMATION INCREASE PROBABILITY OF
WHEEZING IN PRESCHOOL CHILDREN**

To be submitted:

PEDIATRICS

AIRWAY INFLAMMATION INCREASE PROBABILITY OF WHEEZING IN PRESCHOOL CHILDREN

Larissa Bouwman Sayão¹, Maria Cristina Raposo³, Edjane Figueiredo Burity², Armèle Dornelas de Andrade¹, Murilo Carlos Amorim de Britto².

¹ Department of Physiotherapy, Federal University of Pernambuco, Brazil.

² Institute of Integral Medicine Fernando Figueira – IMIP, Brazil.

³ Department of Statistic, Federal University of Pernambuco, Brazil.

Corresponding author:

armeledornelas@yahoo.com

Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Fisioterapia

Av. Jorn. Aníbal Fernandes, s/n. Cidade Universitária.

CEP: 50740-560 - Recife – PE (BRA)

ABSTRACT

Background: Different risk factors can contribute to the occurrence of wheezing, particularly in children. However, there are no studies that report the influence of high airway inflammation for this diagnostic. Therefore, the aim of this study was to identify, among different risk factors, the probability of wheezing in preschool children with high degree of airway inflammation.

Methods: Questionnaire of respiratory diseases was administered to parents of preschoolers at public schools in Brazil. Children were evaluated by the fraction of exhaled nitric oxide (FeNO) using the single breath method. Risk factors for wheezing were assessed using bivariate and multivariate analyzes accordance with the theoretical model to obtain odds ratio outcome.

Results: The sample consisted of 423 children, of which 43% were considered wheezing. After multiple logistic regression analysis the variables which remained associated with wheezing were: allergic rhinitis (OR=2.04; CI95%=1.08-3.84), atopic dermatitis (OR=2.51; CI95%=1.27-4.96), hospitalizations (OR=7.62; CI95%=3.64-15.95) and airway inflammation (OR=8.44; CI95%=2.93-24.29). The estimated probability to develop wheezing with all factors present was 99.5%, while 15.7% were observed in the absence of factors mentioned.

Conclusion: A screening tool such as FeNO may help identify preschoolers at risk of developing wheezing independent of the presence of risk factors.

Keywords: child, exhaled nitric oxide, logistic regression, odds ratio and wheezy.

INTRODUCTION

Wheezing is a common condition in preschool children. It can occur in different lung diseases, through gastroesophageal reflux, foreign body aspiration, and even congenital structural anomaly.¹⁻³ At preschool age, anatomical and functional disadvantages of airway makes wheezing disorders more common, with approximately half of all children up to six years experiencing at least one episode. Despite the reversibility over time, earlier onset of these episodes is associated with greater deterioration of lung function, more persistent symptoms and greater potential for adverse changes in adulthood, such as asthma.⁴⁻⁶

Studies shows that genetic and environmental factors are involved in the pathology of wheezing, and the high interaction between these factors can results in more recurrent episodes and strong expression of the disorder.⁷⁻⁹ Consequently, understanding risk factors influenced wheezing process is fundamental to predict the future expression of asthma.^{9,10}

It is well reported in the literature that birth weight, prematurity, oxygen exposure, smoking exposure, personal and family atopy history, socioeconomic status, as well as sex and age are factors that can influence pulmonary function, cellular growth and bronchial reactivity.¹¹ In addition early post-natal respiratory infections can also interfere on development of respiratory and immune systems maturation. The effects of these factors are related to the presence of inflammatory cells and the release of inflammatory mediators in the airways.⁷⁻¹³

While factors involved in the pathological wheezing process have been identified, studies do not report how the high degree of biomarkers release including nitric oxide (NO) can influence wheezing development as a risk factor. Levels of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) are elevated in asthma, especially when eosinophilic inflammation is present, and predict response to steroid.¹⁴

Therefore, the aim of this study was to determine, through the best model of interaction between potential risk factors, what is the probability of developing wheezing in preschool children with high degree of airway inflammation.

METHOD

Study design and population

A cross-sectional population-based study was performed in order to assess the prevalence and risk factors of wheezing in preschool children, through interviews based on the *American Thoracic Society and Division of Lung Diseases for Children Questionnaire* (ATS-DLD-78–C), previously adapted and validated for use in children less than 13 years.¹⁵ The sample size was calculated based on wheezing prevalence in infants of Medeiros et al. (2011)¹⁶, considering a power of 80%, a confidence interval level of 95% and a maximum permissible error of 5%, the sample size was set in 377 children. In this value was added 10% to compensate the possible losses totaling 423 children.

Interviews were conducted with parents or caregivers of children aged between 3 and 5 years, wheezing or not, who attend day care centers and public schools in the metropolitan region of Recife - Brazil, between the period from March to December 2014. All interviews were standardized and performed by two trained researchers, who were instructed to only read the questions and record answers, and not to provide additional clarification. Preschool children with known history of specific respiratory disease (bronchopulmonary dysplasia, cystic fibrosis, tuberculosis, current airway infection, acute exacerbation of asthma), neurological or genetic diseases were excluded.

Researched variables and data source

Parent or guardians were verbally asked to answer questions about wheezing; demographic factors such as: sex, age, family history of asthma, airway inflammation; socioeconomic status such as: family income, maternal age, maternal education; environmental conditions such as: smoking in residence, smoking during pregnancy, attendance at day cares; gestation and childbirth such as: prematurity, birth weight, oxygen use at birth; breastfeeding; and health conditions such as: hospitalizations, atopic dermatitis, allergic rhinitis and cold symptoms in the last 2 weeks. Children were considered as sibilant if they had presented at least one episode of wheezing in the past six months, in need or not of bronchodilator use⁸; gestational age less than 37 weeks was

classified as premature; children with birth weight less than 2,500g were classified as underweight; and exclusive breastfeeding less than six months was classified as inadequate breastfeeding.

For airway inflammation assessment, children were evaluated to determine the fraction of exhaled nitric oxide by chemiluminescence method using a portable analyzer (NIOX MINO, Aerocrine, Sweden) according with the American Thoracic Society / European Respiratory Society guidelines, expressed in parts per billion (ppb).¹⁷ The children were placed sitting comfortably without nose clip, instructed to inhale the ambient air with nitric oxide removed through a mouthpiece, to approximately total lung capacity, and then, performing exhalation with constant flow rate of 50 ml/s for at least 6 seconds. All evaluations were performed by the same operator, at the subject's school, in a quiet isolated environment, and at the same time of day (morning) thus preventing exposure of the volunteer to extrinsic factors for at least 1 hour before the test, such as: smoke, strenuous physical exercise, nutrition and medication use. Children with FeNO value above to 10 ppb were considered as high degree of airway eosinophilic inflammation.¹⁸

Statistical analysis

The dependent variable in this study is wheezing diagnosis. The independent variables were hierarchical in distal, intermediate and proximal levels in accordance with the theoretical model adopted by WHO¹⁹ (Figure 1). The variables included at the distal level were related to socioeconomic conditions such as family income and maternal education. The cut-off point of family income adopted was thousand real for correspond approximately to the median income of the sample. Another factors included at this level were sex, age, family history of asthma and atopy.

At the intermediate level, the variables were classified in three categories of analysis: environmental factors (passive smoking in residence and smoking during pregnancy), nutritional factors (gestational age, low birth weight and breastfeeding) and child care-related factors (maternal age and maternal marital status). At proximal level were included morbid antecedents of child such as: oxygen use at birth, atopic dermatitis, allergic rhinitis, asthma diagnosis, hospitalizations and airway inflammation (FeNO value).

For all data analysis we used the statistical program SPSS 20.0. Frequency tables were constructed and calculated some descriptive measures such as proportions, means, OR and confidence intervals. To explain the development of wheezing were made two-dimensional analysis using Pearson's independence test or Mann-Whitney test to compare means of non-categorical variables. We proceeded to the bivariate analysis and odds ratio calculation (OR) with confidence interval of 95% (CI 95%) for evaluation of possible associations between studied variables and outcome. In multiple logistic regression analysis were included those variables that reached 20% ($p < 0.20$) of significance level in the bivariate. Considering the distal level as a determinant the other, the variables that level were analyzed separately, and those statistically significant ($p < 0.05$), integrated adjustments of variables of subsequent levels. This procedure it was repeated on until the proximal level.

Ethical considerations

The study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil, under the protocol number CAAE–21377513.5.0000.5208. All responsible relatives were informed about survey goals and signed a free and clear consent form.

RESULTS

In the present study, 474 children's parents were interviewed but only 423 children achieved correct maneuvers to evaluate the degree of airway inflammation (FeNO) (Figure 2). In relation to demographic characteristics of preschoolers, 215 (50.8%) were male and the average (\pm SD) age, weight and height at the time of evaluation were 58.1 (\pm 8.0) months, 18.8 (\pm 3.8) kg, and 106.3 (\pm 6.6) cm, respectively. Regarding the parent or guardian's characteristics, 206 (48.7%) were singles and 183 (43.3%) studied up out of elementary school. The wheezing prevalence observed in this study was 43%.

Tables 1, 2 and 3 show comparisons between wheezing and non-wheezing as to characteristics of interest to bivariate analysis considering the distal, middle and proximal level, respectively. As shown in Table 1, the level of maternal education and sex were not significantly associated with wheezing. The presence of wheezing was significantly more frequent in children with low

family income, age below four years, family history of asthma and atopy ($p=0.135$; $p=0.175$; $p=0.000$ and $p=0.001$, respectively). Risk factors classified as intermediate by the hierarchical model are shown in Table 2. It was observed that children exposed to passive smoking at home have 20% more chance to develop wheezing when compared to non-exposed ($p=0.091$), while those children who had breastfeeding for more than six months showed 20% protection for wheezing, i.e. less chance to trigger the disease ($p=0.125$). For risk factors related to the proximal level, all were significantly associated with wheezing (Table 3).

After multiple logistic regression analysis where adjustments were made by variables of distal to proximal level (Table 4), the variables which remained associated with wheezing in descending order of OR were: allergic rhinitis (OR=2.04), atopic dermatitis (OR=2.51), hospitalizations (OR=7.62) and airway inflammation (OR=8.44). Table 5 shows the distribution of estimated probabilities by regression model to develop wheezing according to possible explanatory factors. For the worst case scenario, when all risk factors are present the probability to develop wheezing was 99.5%. However, even in the absence of all risk factors children still had a 15.7% probability of developing wheezing in preschool age.

DISCUSSION

The findings of this study show that factors such as allergic rhinitis, atopic dermatitis, hospitalizations and high airway inflammation were directly related to risk of developing wheezing in preschoolers.

Previous studies have documented the fraction of exhaled nitric oxide as a sensitive marker of eosinophilic airway inflammation and differentiation wheezing types in preschoolers.¹⁸⁻²¹ High FeNO values are strongly related to more severe phenotypes of disease.²² In the present study, children with grade inflammation ≥ 10 ppb were 8 times more likely to develop wheezing. These findings are consistent with Singer et al. (2013) who evaluated FeNO as a risk factor for asthma at school age, reporting that preschoolers with a FeNO value higher than 10.1 ppb had nine times greater risk when compared to children with FeNO between 0.5 and 5.2 ppb.²³

In 2009, Beigelman et al. also investigated the effect of high FeNO values on development of respiratory tract diseases in preschool wheezing and associated higher FeNO measures with a relative risk of 3.8.²⁴ Therefore, these findings suggest that FeNO is a valuable tool in assessing the probability of developing wheezing, largely because it is a biological marker, unlike the clinical risk factors most frequently reported at the literature.

Hospitalizations for lung disorder up to two years of age were closely related as a risk factor for developing wheezing in preschool children with a relative risk of 7.62. This found may be explained because children with recurrent hospitalizations in early life are more frequently subjected to oxygen therapy and possibly accumulate the negative effects of O₂.^{7, 25} Inhalation of high oxygen fraction leads to presence of free radicals, superoxide, hydrogen peroxide and peridroxil radicals overproduction which damage the lungs, causing leukocytes migration and inflammatory mediators release. Depending on the intensity and the exposure time, these effects are aggravated and may progress to develop chronic lung disease.²⁶

A meta-analysis by Been et al. (2014) investigated the risk of developing asthma and wheezing in children born prematurely. There was evidence that premature birth (especially severe) increases the risk of asthma and the oxygen exposure was described as an important factor involved. Authors explained that it occurs because the oxygen exposure is a common need in the first days of birth for this population.⁷ More likely, the presence of lung disease at that age is associated with some form of inflammation of the airway or lung parenchyma. The release of inflammatory mediators caused by O₂ exposure or chronic inflammation can lead to diffuse alveolar damage, persistent pulmonary damage and thus more likely to develop a symptomatology such as wheezing.²⁵⁻²⁷

Atopic dermatitis and allergic rhinitis present the same chance to develop wheezing. These two conditions together with asthma are the classical triad of atopic disease. Clinical signs progression, generally starting with the dermatitis, after allergic rhinitis and progressing to chronic asthma, represents the natural course of allergic reactions, also known as atopic march.²⁸ Mechanisms involving the progressive development of these diseases are still poorly understood, but it is believed there are genetic and immunological basis

common among these three diseases, differing only as to the part of the body that will manifest: skin for dermatitis, nose for rhinitis and airways to asthma. Therefore, children with dermatitis or rhinitis have previously sensitized lymphocytes, either by epicutaneous or respiratory tract, which when in contact with the antigen, are activated by releasing cytokines that recruit inflammatory cascade and predispose to wheezing.²⁸

Linhares et al. (2011) confirmed the impact of allergic rhinitis in airway inflammation through exhaled nitric oxide values. Children with rhinitis have higher FeNO values when compared to healthy, and this relationship is even stronger when associated with atopy.²⁹ Subsequently, Jacinto et al. (2013) published a systematic review of influence factors in FeNO measurement and was observed that atopy investigation, as a specific individual factor, it was objective of most studies.³⁰

Analyzing the wheezing probability by risk factors combination, it was seen that for the worst outcome, i.e. presence of all factors, preschool of this study present 99.5% chance to wheezing developing. This information reflects the severity of the risk factors interaction and reinforces the idea that it is necessary early treatment of potential children. On the other hand, although low, the absence of any risk factors investigated in this study is associated with a 15.7% chance of wheezing developing and it may be explained by etiological heterogeneity of this disease.³¹⁻³⁵

Probably, our limitation was due to study design, particularly because in a cross-sectional is not possible to follow the progression of risk factors over time. However, the predictive use of FeNO provides identification of children with and without apparent risk factors who may develop wheezing. Consequently, there is likely a role for screening of preschool children to support early intervention prior to development of severe lung inflammation, especially because early intervention may reduce health care costs for a life time. In conclusion, our results suggest that a screening tool such as FeNO may help identify preschool children at risk of developing wheezing independent of the presence of risk factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco) and CAPES/PROCAD-NF (Grant no. 792/2009) as responsible Prof. Armèle Dornelas de Andrade.

REFERENCES

1. Ducharme F, Tse SM, Chauhan B. Diagnosis, management, and prognosis of preschool wheeze. *Lancet*. 2014; 383(3): 1593-604.
2. Hovland V, Riiser A, Mowinckel P, Carlsen K. The significance of early recurrent wheeze for asthma outcomes in late childhood. *Eur Respir J*. 2013;41(4):838–845.
3. Neto H & Rosário N. Wheezing in infancy: epidemiology, investigation, and treatment. *J Pediatr*. 2010; 86(3):171-178.
4. Solé D. Childhood wheezing. *J Bras Pneumol*. 2008; 34(6): 337-339.
5. Sonnappa S, Bastardo C M, Wade A, et al. Symptom-pattern phenotype and pulmonary function in preschool wheezers. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126(3): 519–526.
6. Tenero L, Tezza G, Cattazzo E, Piacentini G. Wheezing in preschool children. *Early Hum Dev*. 2013; 89(3): 13-17.
7. Been J, Lugtenberg M, Smets E, et al. Preterm Birth and Childhood Wheezing Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med*. 2014;11(1).
8. Dela Bianca A, Wandalsen G, Solé D. Wheezing infant : prevalence and risk factors. *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol*. 2010;33(2): 43–50.
9. Lima JAB, Fischer GB, Sarria EE, Mattiello R, Solé D. Prevalence of and risk factors for wheezing in the first year of life. *J Bras Pneumol*. 2010; 36(5): 525-531.
10. Visser CA, Garcia-Marcos L, Eggink J, Brand PL. Prevalence and risk factors of wheeze in Dutch infants in their first year of life. *Pediatr Pulmonol*. 2010; 45(2): 149-56.
11. Duijts I, Jaddoe VWV, Van der Valk RJP, Henderson JA, et al. Fetal Exposure to Maternal and Paternal Smoking and the Risks of Wheezing in Preschool Children. *Chest*. 2012; 141(4): 876-885.
12. Garcia-Marcos L, Mallo J, Solé D, Brand PLP. International study of wheezing in infants: risk factors in affluent and non-affluent countries during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010; 1-11.
13. Neto H & Rosário NA. Protection and risk factors for recurrent wheezing in the first year of life in Curitiba. *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol*. 2009; 32(5):189-193.
14. Sivan Y, Gadish T, Fireman E, Soferman R. The use of exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma in school children. *J Pediatr* 2009;155:211-6.

15. Esteves AZ. Adaptação e validação do questionário ATS-DLD-78-C, para diagnóstico de asma em crianças com até 13 anos. [Dissertação]. 1995. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo.
16. Medeiros D, Silva A, Rizzo J, Sarinho E, Mallol J, Solé D. Prevalence of wheezing and associated risk factors among infants in Recife, Pernambuco State, Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 2011;27(8):1551-1559.
17. American Thoracic Society/European Respiratory Society. Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171: 912–930.
18. Moeller A, Diefenbacher C, Lehmann A, et al. Exhaled nitric oxide distinguishes between subgroups of preschool children with respiratory symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(3):705–709.
19. World Health Organization. Preventing chronic diseases: a vital investment. Geneva: World Health Organization; 2005.
20. Malmberg L, Pelkonen A, Haahtela T, Turpeinen M. Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax*. 2003; 58:494–499.
21. Oh M.-A, Shim J, Jung Y.-H, et al. Fraction of exhaled nitric oxide and wheezing phenotypes in preschool children. *Pediatr Pulmonol*. 2013;48(6):563–570.
22. Price D, Ryan D, Burden A, et al. Using fractional exhaled nitric oxide (FeNO) to diagnose steroid-responsive disease and guide asthma management in routine care. *Clin Transl Allergy*. 2013; 3(1): 37.
23. Singer F, Luchsinger I, Inci D, et al. Exhaled nitric oxide in symptomatic children at preschool age predicts later asthma. *Allergy*. 2013;68:531–538.
24. Beigelman A, Mauger DT, Phillips BR, et al. Effect of elevated exhaled nitric oxide levels on the risk of respiratory tract illness in preschool-aged children with moderate-to-severe intermittent wheezing. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009; 103:108–113.
25. Caudri D, Savenije O, Smit H, et al. Perinatal risk factors for wheezing phenotypes in the first 8 years of life. *Clin Exp Allergy*. 2013;43:1395–1405.
26. Lodge CJ, Zaloumis S, Lowe AJ, et al. Early-life risk factors for childhood wheeze phenotypes in a high-risk birth cohort. *J Pediatr*. 2014; 164(2): 289–294.
27. Neto H & Rosário NA. Risk factors for wheezing in the first year of life. *J Pediatr*. 2008; 84(6): 495-502.

28. Boechat JL, França AT. Marcha atópica. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.* 2008; 31(4):139-145.
29. Linhares D, Jacinto T, Pereira AM, Fonseca JA. Effects of atopy and rhinitis on exhaled nitric oxide values - a systematic review. *Clin Transl Allergy.* 2011; 1(8): 1–7.
30. Jacinto T, Alving K, Correia R, Costa-Pereira A, Fonseca J. Setting reference values for exhaled nitric oxide: a systematic review. *Clin Respir J.* 2013; 7: 113-120.
31. Dela Bianca A, Wandalsen G, Mallol J, Solé D. Risk factors for wheezing disorders in infants in the first year of life living in São Paulo, Brazil. *J Trop Pediatr.* 2012; 1-4.
32. Bener A, Ehlayel MS, Alsowaidi S, Sabbah A. Role of breast feeding in primary prevention of asthma and allergic diseases in a traditional society. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2007; 39(10): 337-343.
33. Brew BK, Allen CW, Toelle BG, Marks GB. Systematic review and meta-analysis investigating breast feeding and childhood wheezing illness. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2011; 25: 507–518.
34. Guibas GV, Xepapadaki P, Moschonis G, et al. Breastfeeding and wheeze prevalence in pre-schoolers and pre-adolescents: The Genesis and Healthy Growth studies. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013; 24: 772–781.
35. Kramer MS. Invited commentary: Does breastfeeding protect against asthma? *Am J Epidemiol.* 2014; 179(10): 1168–1170.

TABLES

Table 1: Distribution of wheezing cases in preschoolers, odds ratio (OR) and respective confidence intervals of 95% (CI 95%) according to variables of distal level.

Variables	Wheezing (%)		Total	OR (CI 95%)	P-value
	Yes	No			
Family Income					
< R\$ 1.000,00	71,2	79,6	76,1%	1,413 (0,911-2,193)	0,135
≥ R\$ 1.000,00	28,8	20,4	23,9%	0,894 (0,772-1,036)	
Maternal Education (years)					
≤ 8	54,8	56,5	55,8%	0,971 (0,775-1,216)	0,798
> 8	45,2	43,5	44,2%	1,038 (0,784-1,374)	
Sex					
Male	49,0	51,0	50,2%	0,961 (0,747-1,237)	0,907
Female	51,0	49,0	49,8%	1,040 (0,810-1,337)	
Age					
≤ 4 years	21,2	14,3	17,1%	1,481 (0,861-2,548)	0,175
> 4 years	78,8	85,7	82,9%	0,920 (0,816-1,037)	
Family History of Asthma					
Yes	74,0	51,7	61%	1,432 (1,180-1,737)	0,000
No	26,0	48,3	39%	0,538 (0,373-0,774)	
Atopy					
Yes	90,4	72,8	80,1%	1,242 (1,105-1,396)	0,001
No	9,6	27,2	19,9%	0,353 (0,185-0,674)	

Table 2: Distribution of wheezing cases in preschoolers, odds ratio (OR) and respective confidence intervals of 95% (CI 95%) according to variables of intermediate level.

Variables	Wheezing (%)		Total	OR (CI 95%)	P-value
	Yes	No			
Passive Smoking at Home					
Yes	65,4	54,4	59,0%	1,201 (0,980-1,473)	0,091
No	34,6	45,6	41,0%	0,759 (0,553-1,044)	
Passive Smoking in Pregnancy					
Yes	18,3	17,7	17,9%	1,033 (0,605-1,765)	1,0
No	81,7	82,3	82,1%	0,993 (0,883-1,117)	
Gestational Age					
≥ 37 weeks	81,7	84,4	83,3%	0,969 (0,864-1,086)	0,610
< 37 weeks	18,3	15,6	16,7%	1,168 (0,671-2,030)	
Weight at Birth					
≥ 2.500g	85,6	90,5	88,4%	0,946 (0,860-1,040)	0,237
< 2.500g	14,4	9,5	11,6%	1,514 (0,764-3,000)	
Breastfeeding					
< 6 months	59,6	49,7	53,8%	1,200 (0,957-1,506)	0,125
≥ 6 months	40,4	50,3	46,2%	0,802 (0,604-1,065)	
Maternal Marital Status					
Single	33,7	33,3	33,5%	1,010 (0,709-1,438)	1,0
Married	66,3	66,7	66,5%	0,995 (0,833-1,189)	
Maternal Age					
≤ 30 years	55,8	53,1	54,2%	1,051 (0,836-1,321)	0,701
> 30 years	44,2	46,9	45,8%	0,942 (0,715-1,242)	

Table 3: Distribution of wheezing cases in preschoolers, odds ratio (OR) and respective confidence intervals of 95% (CI 95%) according to variables of proximal level.

Variables	Wheezing (%)		Total	OR (CI 95%)	P-value
	Yes	No			
O ₂ Use at Birth					
Yes	20,2	7,5	12,7%	2,698 (1,360-5,352)	0,004
No	79,8	92,5	87,3%	0,863 (0,775-0,960)	
Atopic Dermatitis					
Yes	37,5	17,7	25,9%	2,120 (1,382-3,253)	0,001
No	62,5	82,3	74,1%	0,759 (0,643-0,897)	
Allergic Rhinitis					
Yes	48,1	23,8	33,9%	2,019 (1,421-2,870)	0,000
No	51,9	76,2	66,1%	0,681 (0,555-0,837)	
Asthma Diagnostic					
Yes	12,5	0,0	5,2%	-	0,000
No	87,5	100,0	94,8%	0,875 (0,814-0,941)	
Hospitalizations					
Yes	43,3	8,8	23,1%	4,893 (2,784-8,598)	0,000
No	56,7	91,2	76,9%	0,622 (0,522-0,742)	
Airway Inflammation					
< 10ppb	74,0	96,6	87,3%	0,766 (0,681-0,862)	0,000
≥ 10ppb	26,0	3,4	12,7%	7,633 (3,040-19,164)	

Table 4: Final model of wheezing cases distribution in preschoolers, odds ratio adjusted (OR_{adjusted}) and respective confidence intervals of 95% (CI 95%) according to variables of distal to proximal level.

Variables	OR _{adjusted}	CI 95%	P-value
Allergic Rhinitis	2,045	1,087-3,849	0,027
Atopic Dermatitis	2,519	1,279-4,962	0,008
Hospitalizations	7,621	3,640-15,954	0,000
Airway Inflammation	8,444	2,935-24,294	0,000

Table 5: Estimated probabilities by hierarchical regression model to develop wheezing in preschoolers according to risk factors.

		NORMAL AIRWAY INFLAMMATION		HIGH AIRWAY INFLAMMATION	
ALLERGIC RHINITIS	HOSPITALIZATIONS	NO ATOPIC DERMATITIS	ATOPIC DERMATITIS	NO ATOPIC DERMATITIS	ATOPIC DERMATITIS
	YES	86,2	94,7	98,6	99,5
		74,2	89,2	97,1	98,9
YES	NO	46,7	71,6	91,1	96,7
		28,6	53,6	82,4	93,1
	YES	74,4	89,3	97,1	98,9
		57,1	79,3	93,9	97,8
NO	NO	28,9	53,9	82,6	94,0
		15,7	34,9	68,5	86,2

Figure 1: Theoretical model analysis of risk factors for wheezing in preschool children.

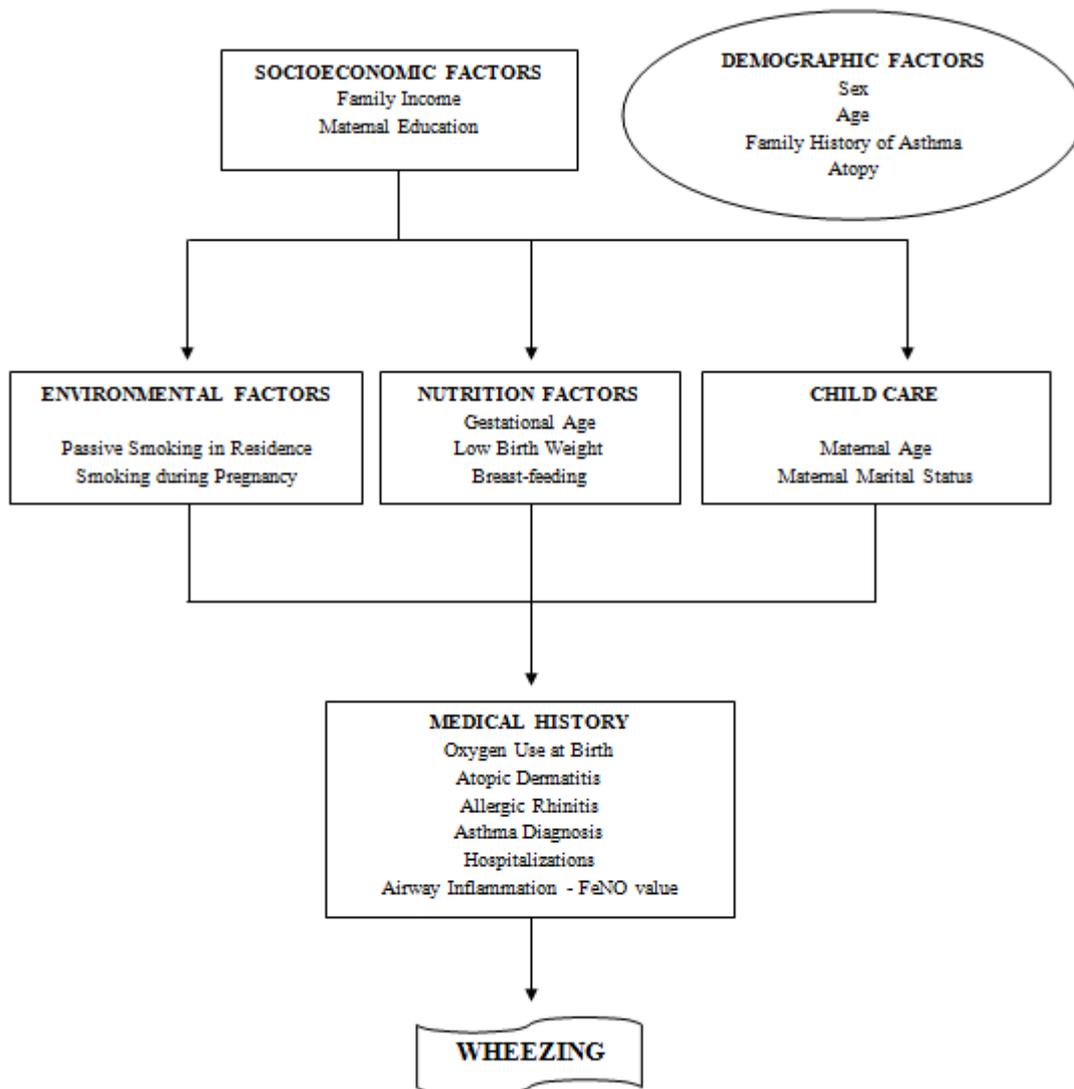
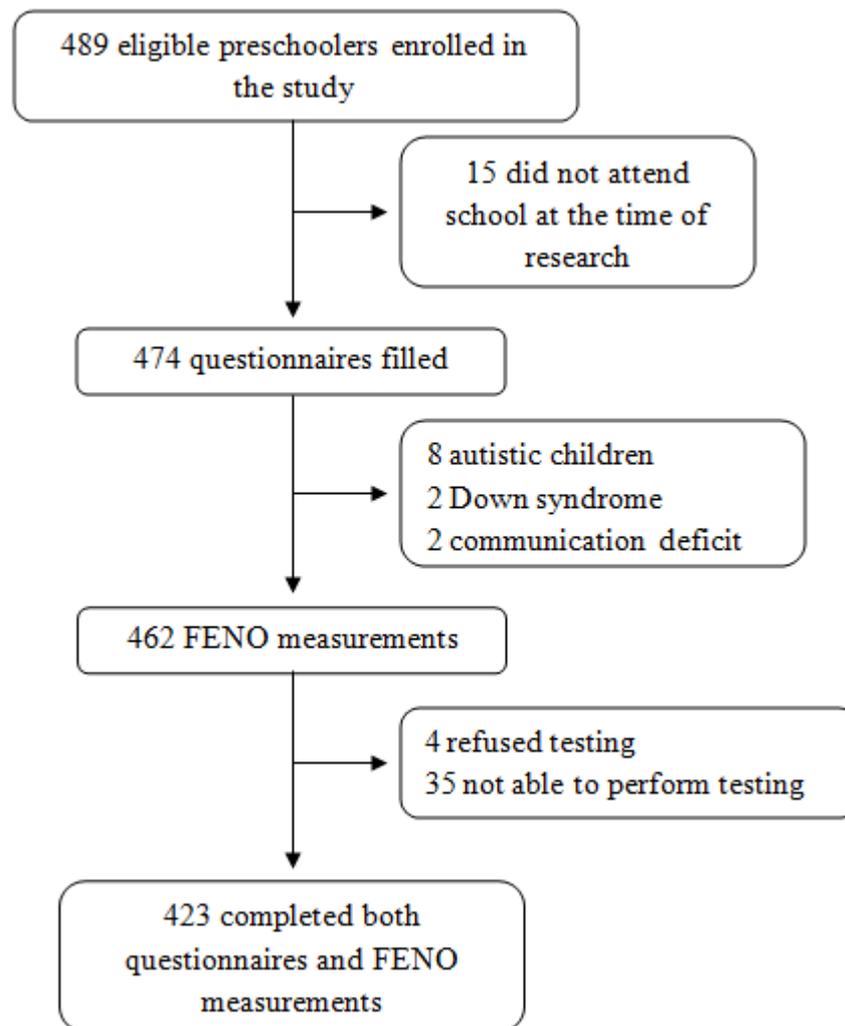


Figure 2: Flow chart of participant selection.



APÊNDICE 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA O RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 12 ANOS – RESOLUÇÃO 466/12

Convidamos o Senhor (a) e solicitamos a sua autorização para convidar o seu filho (a), ou o menor de 3 a 5 anos que está sob sua responsabilidade, para participar, como voluntários (as), da pesquisa “Fração exalada de óxido nítrico na discriminação de sibilância recorrentes em pré-escolares da cidade do Recife: um estudo de acurácia”. Esta pesquisa é da responsabilidade da pesquisadora Larissa Bouwman Sayão, Rua São Mateus, 1060, Iputinga – Recife, CEP: 50680-000 / Telefone: (81) 9853-6308, lbsayao@hotmail.com e está sob a orientação de: Murilo Carlos de Amorim Britto. Telefone: (81) 8837-9852, murilodebritto@gmail.com. Também participa também desta pesquisa a pesquisadora: Armele Dornelas de Andrade. Telefone: (81) 8781-8965, armeledornelas@hotmail.com.

Este documento se chama Termo de Consentimento e pode conter alguns tópicos que o senhor (a) não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe solicitando, para que o senhor (a) esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que será feito. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a sua participação e a participação do (a) menor no estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa nem o Sr. (a) nem a criança que está sob sua responsabilidade serão penalizados. O Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação e do (a) menor a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

- Trata-se de um estudo de diagnóstico pulmonar, onde iremos medir a quantidade do gás **óxido nítrico** que existe no momento da exalação (quando soltamos o ar dos pulmões). Esse estudo é importante porque permite que médicos e fisioterapeutas conheçam a probabilidade do seu filho (a) desenvolver asma;
- O teste é chamado **FENO** (fração exalada de óxido nítrico) e consiste em que a criança respire normalmente com a boca acoplada a um filtro **descartável e esterilizado**, adaptado a um aparelho. Esse procedimento demora cerca de 10 minutos e não haverá prejuízo caso seu filho não consiga respirar de maneira adequada.
- A medição será feita na própria escola, em ambiente adequado e horário permitido pelo diretor da escola. Ou seja, sem prejudicar a participação do seu filho (a) na sala de aula;
- O risco oferecido por essa avaliação consiste no constrangimento, choro ou recusa da criança em realizar a manobra. Como forma de minimizar, a medição será feita em local adequado, conduzida por pesquisador experiente e habilitado que fornecerá instrução para correta realização da técnica. Caso o risco persista, a avaliação será interrompida.
- Como benefício direto da pesquisa, você receberá o diagnóstico do quadro de inflamação das vias aéreas do seu filho (a) e orientações

adequadas para a correta condução da criança caso esta apresente valores condizentes com alteração pulmonar.

- O Senhor (a) participará da pesquisa respondendo a um questionário com perguntas objetivas sobre as condições respiratórias do seu filho (a). O risco oferecido por essa avaliação consiste no constrangimento em responder questões relacionadas ao seu filho (a), mas para minimizar esse risco, o procedimento será feito em local reservado, e as informações colhidas serão mantidas em sigilo pelo pesquisador.

As informações desta pesquisa são confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação do voluntário (a). Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo de um computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período de até 5 anos. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – Prédio do CCS - 1º Andar, sala 4 – Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600. Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

Assinatura do pesquisador responsável

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DO (A) VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, responsável por _____, autorizo a sua participação e aceito participar do estudo “Fração exalada de óxido nítrico na discriminação de sibilância recorrentes em pré-escolares da cidade do Recife: um estudo de acurácia”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da nossa participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento e do meu filho a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade para mim ou para ele (a).

Local e data: _____

Assinatura do (a) responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar (Testemunhas):

Nome:

Assinatura:

Nome:

Assinatura:

APÊNDICE 5 – LISTA DE CHECAGEM PADRONIZADA

Data da avaliação: ____/____/____

Formulário N° □□□

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Responsável: _____

Parentesco do responsável pela entrevista: _____

Escola: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: Masc Fem

Telefone: _____

VARIÁVEIS BIOLÓGICAS

1. Cor:

(1) Branca (2) Amarela (3) Negra (4) Parda (5) Outra (6) Não sabe

2. Peso (Kg): _____ (moda da triplicata)

3. Altura (cm): _____ (moda da triplicata)

VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS

1. Procedência:

(1) Recife e RMR (2) Interior (3) Outro: _____

2. Pessoas que moram na casa:

- Pai natural Padrasto Não possui pai ou padrasto
 Mãe natural Madrasta Não possui mãe ou madrasta
 Irmãos. Quantos no total? _____
 Empregados que dormem no emprego. Quantos? _____
 Outras pessoas. Quantas? _____

3. Total de pessoas que moram na casa: _____

4. Idade da mãe/madrasta ou principal responsável: _____ anos

5. Instrução da mãe / madrasta ou principal responsável:

- (1) Sem instrução (2) Primeiro grau incompleto (3) Primeiro grau completo
 (4) Segundo grau incompleto (4) Segundo grau completo (5) Superior

6. Estado civil da mãe / madrasta ou principal responsável:

- (1) Casada (2) Solteira (3) Divorciada ou separada (4) Viúva
 (5) Vive junto

7. Renda total do trabalho principal do chefe de família:

Salário líquido: R\$ _____,00 Não sabe o valor

8. Caso você não saiba o valor total, sabe informar se foi:

- Menos de R\$ 200,00 de R\$ 200,00 a 400,00 de R\$ 400,00 a 600,00
 de R\$ 600,00 a 800,00 de R\$ 800,00 a 1000,00 de R\$ 1000,00 a 1200,00
 de R\$ 1200,00 a 1600,00 de R\$ 1600,00 a 2000,00 mais de R\$ 2000,00
 Não sabe o valor

9. Renda total de outros trabalhos do chefe de família (ex.: aposentadoria, aluguéis):

- Não tem Tem. Quanto ganhou no mês passado? _____
 Não sabe / não se lembra

10. Renda de outras pessoas que moram na casa (sem contar com o chefe de família): _____

11. Renda do programa bolsa-família do Governo:

- Não recebe Recebe. R\$ _____,00
 Não sabe / não se lembra.

VARIÁVEIS RELACIONADAS AO TABAGISMO PASSIVO

1. A mãe da criança é fumante?

- Não Sim Não sabe

2. A mãe da criança fumou durante a gravidez?

- Não Sim Não sabe

3. O pai da criança é fumante?

- Não Sim Não sabe

4. Algum outro membro da família que possua contato direto com a criança é fumante (madrasta, padrasto, irmão (a), babá)?

- Não Sim Não sabe

5. Caso a criança possua contato com algum fumante, com que frequência na semana ela é exposta ao fumo?

- Todos os dias da semana 4 ou mais dias / semana Menos de 4 dias / semana
 Não sabe/ não lembra

6. Com que frequência no dia a criança é exposta ao fumo?

Mais de 3x / dia Menos de 3x / dia Não sabe/ não lembra

VARIÁVEIS RELACIONADAS AO PERÍODO NEONATAL:

1. Peso do seu filho ao nascimento: < 2.500gr () ≥ 2.500gr ()

2. Tempo de gestação ao nascimento: ≥ 37semanas () <37semanas ()

3. Teve cansaço ao nascimento, necessitando de uso de oxigênio por mais de 24 horas? Sim () Não ()

4. Seu filho (a) chegou a mamar no peito?

Nunca Mamou, por _____.

5. Mamou de forma exclusiva por quanto tempo?

Nunca Mamou, por _____.

VARIÁVEIS RELACIONADAS À ATOPIA:

1. O seu filho (a) possui parentes com algum histórico de asma, rinite alérgica, dermatite atópica, eczema, alergia alimentar ou qualquer outra predisposição a reações alérgicas?

Não Sim. Qual tipo? _____ Não sabe

2. Seu filho (a) apresenta ou já apresentou quadros de manchas avermelhadas inflamatórias com placas crostosas que cocem ou não, na região da face, pescoço, virilha ou dobras (dermatite atópica)?

Não Sim Não sabe

3. Alguma vez na vida sua criança apresentou roncos pelo nariz durante o sono?

Não Sim Não sabe

4. Se sim, com que frequência?

Menos que 1 vez/ mês Entre 1 vez/ mês a 3 vezes / semana

4 ou mais dias/ semana Não sabe/ não lembra

5. Há quanto tempo?

Menos de 3 meses 3 a 6 meses de 7 meses a 1 ano

+ de 1 ano a 3 anos + de 3 anos Não sabe/ não lembra

6. Esses episódios de falta de ar ou roncos pelo nariz provocam pausas respiratórias ao dormir?

Não Sim Não sabe

7. Seu filho gripa com muita frequência, vive com o nariz corizando ou obstruído?

Não Sim Não sabe

ANEXO I – CARTA DE ANUÊNCIA

PREFEITURA DO
RECIFESECRETARIA DE EDUCAÇÃO
SECRETARIA EXECUTIVA DE GESTÃO PEDAGÓGICA

Recife, 04 de novembro de 2013.

CARTA DE ANUÊNCIA

Informamos que **Larissa Bouwman Sayão**, aluna do curso de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, está autorizada por esta Secretaria a realizar um estudo observacional para diagnóstico de inflamação em vias aéreas inferiores por meio de concentração da fração exalada de óxido nítrico. O teste será aplicado em crianças pré-escolares de 3-5 anos que apresentem histórico de sibilância ou não. As medições são práticas, rápidas e não oferecem risco à criança.

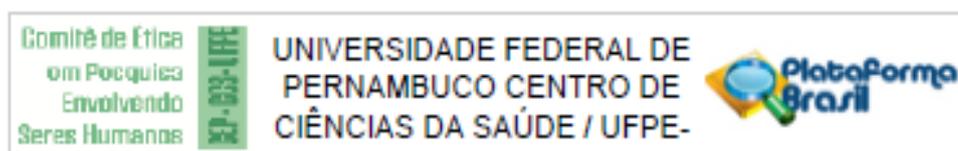
Salientamos que em caso de ações de filmagens ou fotografia, a estudante deverá solicitar autorização por escrito aos indivíduos/responsáveis envolvidos no referido estudo.

Atenciosamente,

Angélica Pitanga
mat. 61720-2
p/ Adilza Gomes
Mat. 32.903-0

Prefeitura do Recife
Sec. Educação
Diretoria Geral de Ensino
Prefeitura do Recife
Sec. Educação
Diretoria Geral de Ensino

ANEXO II – PARECER FINAL DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS – UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FRAÇÃO EXALADA DO ÓXIDO NÍTRICO NA DISCRIMINAÇÃO DE SIBILÂNCIA RECORRENTE EM PRÉ-ESCOLARES DA CIDADE DO RECIFE: UM ESTUDO DE ACURÁCIA

Pesquisador: LARISSA SAYÃO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21377513.5.0000.5208

Instituição Proponente: Departamento de Fisioterapia - DEFISIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Envio de relatório final.

Data do Envio: 28/04/2015

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.059.425

Data da Relatoria: 30/04/2015

Apresentação da Notificação:

A notificação foi apresentada para avaliação do relatório final da pesquisa

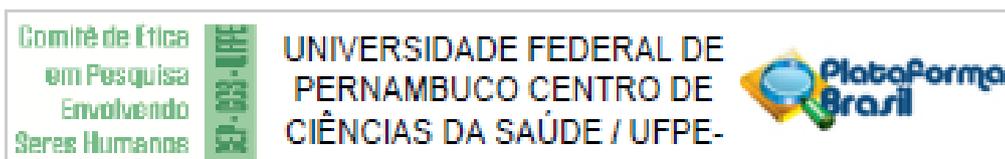
Objetivo da Notificação:

O pesquisador solicita a aprovação do relatório final da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O TCLE foi apresentado no projeto inicial com Riscos e Benefícios e devidamente utilizados pelo

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2128-8588 **E-mail:** cepcos@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.059.425

pesquisador.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A notificação foi apresentada com o relatório e o mesmo está adequado e indicou resultados e conclusão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram considerados adequados

Recomendações:

sem recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Relatório Final foi analisado e APROVADO pelo colegiado do CEP.

RECIFE, 12 de Maio de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br

ANEXO III – QUESTIONÁRIO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS ATS – DLD – 78 – C

1. **A)** A criança costuma tossir algumas vezes por dia, 4 ou mais dias por semana?
SIM () 1 NÃO () 0
- B)** Costuma tossir desse modo na maioria dos dias, por 3 meses seguidos, ou mais, durante o ano? SIM () 1 NÃO () 0
2. A criança costuma ter chiado no peito:
- A)** Somente quando está resfriada? SIM () 1 NÃO () 0
- B)** Ocasionalmente, mesmo sem estar resfriada? SIM () 1 NÃO () 0
- C)** Tem chiado na maioria dos dias ou noites? SIM () 1 NÃO () 0
3. **A)** Alguma vez a criança apresentou episódio de chiado que causou falta de ar ou fôlego curto? SIM () 1 NÃO () 0
- Caso a resposta seja SIM:
- B)** A criança teve 2 ou mais dessas crises? SIM () 1 NÃO () 0
- C)** Alguma vez precisou tomar remédio para aliviar a (s) crise(s)?
SIM () 1 NÃO () 0
4. A criança teve episódios de chiado após jogos ou exercícios?
SIM () 2 NÃO () 0
5. **A)** Durante os últimos 3 anos a criança apresentou alguma doença torácica que a afastou das suas atividades usuais por 3 dias ou mais?
SIM () 1 NÃO () 0
- Caso a resposta seja SIM:
- B)** A criança apresentou aumento de expectoração ou catarro no peito mais do que o usual durante algumas dessas doenças?
SIM () 1 NÃO () 0 Não sabe referir () 0
- C)** Quantas doenças desse tipo ela apresentou no últimos 3 anos?
1 – 2 a 5 doenças por ano ()
2 – mais do que 5 doenças por ano ()
3 – não sabe referir () 0
Item 1 e/ou item 2 SIM: 1 ponto
6. A criança foi hospitalizada por doença pulmonar grave ou “com catarro no peito” antes dos 2 anos de idade?

1 – SIM, somente 1 vez ()

2 – SIM, 2 vezes ()

3 - SIM, 3 ou mais vezes ()

4 - NÃO ()

Item 2 e/ou item 3 SIM: 1 ponto

7. A criança apresentou algumas das seguintes doenças e caso sim, em que idade?

A) Bronquiolite SIM () NÃO () 0

B) Bronquite SIM () NÃO () 0

C) B. Asmática SIM () NÃO () 0

D) Pneumonia SIM () NÃO () 0

Item A e/ou B e/ou C e/ou D SIM: 1 ponto

8. A) Foi feito diagnóstico por médico de: asma, bronquite asmática ou bronquite alérgica? SIM () 2 NÃO () 0

Caso a resposta seja SIM:

B) Ainda tem asma? SIM () NÃO () 0

C) A criança utiliza medicamentos frequentemente para asma?
SIM () NÃO () 0

Item B e/ou C SIM: 1 ponto

9. A) Alguma vez foi dito por médico que a criança apresentou reação alérgica por alimento ou droga?

1 – SIM, alimento somente ()

2 – SIM, droga somente ()

3 – SIM, ambos, alimento e droga ()

4 – NÃO ()

B) Alguma vez foi dito por médico que a criança apresentava reação alérgica por poeira?

SIM () NÃO () 0

C) Alguma vez foi dito por médico que a criança apresentava reação alérgica cutânea por detergentes ou outros produtos químicos?

SIM () NÃO () 0

D) Alguma vez foi dito por médico que a criança apresentava reação alérgica a picada de insetos?

SIM () NÃO () 0

E) Alguma vez a criança recebeu injeções para a alergia?

SIM () NÃO () 0

Resposta SIM a qualquer item de A e/ou B e/ou C e/ou D e/ou E: 1 ponto.

Escore global ≥ 7 = a asma

**PERGUNTAS COMPLEMENTARES AO QUESTIONARIO ATS-DLD-78-C-M,
FORMULADAS POR ESSES PESQUISADORES:**

Se seu filho já estiver apresentado episódio de chiado no peito que causou falta de ar ou fôlego curto, caracterizado por sibilância, aconteceu quantas vezes nos últimos seis meses?

- 1 vez 2 vezes 3 vezes De 3 a 6 vezes Mais de 6 vezes

O primeiro episódio de sibilância aconteceu antes ou depois dos três anos de idade?

- Antes Depois Não sabe

Quem respondeu o questionário:

- Pai Mãe Avós Outro responsável

Alzira Rosa Esteves

Tese de Mestrado, Departamento de Pediatria UNIFESP, 1995.

“Adaptação e validação do questionário ATS-DLD-78-C, para diagnóstico de asma em crianças com até 13 anos”.

Contato: fone comercial: 5575 879 BIP 55080730 cód. 4361233

Correspondência: Rua Mirassol 285, ap 7 – CEP: 04044-010 São Paulo, SP

ANEXO IV – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

The influence of supine posture on chest wall volume changes is higher in obese than in normal weight children

Leticia Silva, Jacqueline de Melo Barcelar, Catarina Souza Rattes, Larissa Bouwman Sayão, Cyda Albuquerque Reinaux, Shirley L. Campos, Daniella Cunha Brandão, Guilherme Fregonezi, Andrea Aliverti, and Armêle Dornelas de Andrade

Abstract: The objective of this study was to analyze thoraco-abdominal kinematics in obese children in seated and supine positions during spontaneous quiet breathing. An observational study of pulmonary function and chest wall volume assessed by optoelectronic plethysmography was conducted on 35 children aged 8–12 years that were divided into 2 groups according to weight/height ratio percentiles: there were 18 obese children with percentiles greater than 95 and 17 normal weight children with percentiles of 5–85. Pulmonary function (forced expiratory volume in 1 s (FEV₁); forced vital capacity (FVC); and FEV₁/FVC ratio), ventilatory pattern, total and compartment chest wall volume variations, and thoraco-abdominal asynchronies were evaluated. Tidal volume was greater in seated position. Pulmonary and abdominal rib cage tidal volume and their percentage contribution to tidal volume were smaller in supine position in both obese and control children, while abdominal tidal volume and its percentage contribution was greater in the supine position only in obese children and not in controls. No statistically significant differences were found between obese and control children and between supine and seated positions regarding thoraco-abdominal asynchronies. We conclude that in obese children thoraco-abdominal kinematics is influenced by supine posture, with an increase of the abdominal and a decreased rib cage contribution to ventilation, suggesting that in this posture areas of hypoventilation can occur in the lung.

Key words: child, obesity, position, respiratory function tests, kinematics, instrumentation, optoelectronic plethysmography.

Résumé : Cette étude se propose d'analyser la cinétique thoraco-abdominale chez des enfants obèses en position assise et couchée dans une condition de respiration naturellement calme. Dans cette étude d'observation, on évalue par pléthysmographie optoélectronique la fonction pulmonaire et le volume de la cage thoracique de 35 enfants âgés de 8 à 12 ans divisés en deux groupes selon le ratio masse/stature en percentile : 18 enfants obèses au-dessus du 95^e percentile et 17 enfants de poids normal situés entre le 5^e et le 85^e percentile. On évalue la fonction pulmonaire [volume expiratoire maximal par seconde ($\dot{V}_{E_{1s}}$); capacité vitale forcée ($\dot{V}_{C_{1s}}$); rapport FEV₁/FVC], le type ventilatoire, le volume total et les compartiments de la cage thoracique ainsi que les asynchronismes thoraco-abdominaux. Le volume courant est plus grand en position assise. Le volume courant du compartiment pulmonaire et du compartiment abdominal de la cage thoracique ainsi que leur contribution respective en pourcentage au volume courant sont plus faibles en position couchée chez les deux groupes d'enfants, mais le volume courant abdominal et sa contribution en pourcentage au volume courant sont plus grands chez les enfants obèses en position couchée que chez les enfants du groupe de contrôle. On n'observe pas de différences statistiquement significatives d'asynchronismes thoraco-abdominaux entre les enfants obèses et ceux du groupe de contrôle et entre la position couchée et la position debout. En conclusion, la cinématique thoraco-abdominale des enfants obèses est soumise à l'influence de la position couchée par une augmentation de la contribution abdominale et une diminution de la contribution thoracique à la ventilation; dès lors, les poumons pourraient présenter des zones de hypoventilation en position couchée. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : enfant, obésité, position, tests de fonction respiratoire, cinématique, instrumentation, pléthysmographie optoélectronique.

Introduction

Childhood obesity is a major public health problem. In addition to the psychological impact on self-esteem and quality of life, there is evidence that the condition has a significant effect on lung function and can lead to an increased risk of developing respiratory disease in adulthood (Dreher and Kabitz 2012; Linderson 2012; Laguna et al. 2013; Butrima et al. 2014).

The accumulation of adipose tissue in the thorax and abdomen in children with body mass index (BMI) above 30 kg/m² is nega-

tively correlated with static lung volume (Li et al. 2003). This decrease in the amplitude of thoracic and diaphragmatic movement is associated with lung compliance and determines an increase in breathing effort (Deane and Thomson 2006; Florino and Brooks 2009).

The transition from standing to supine posture can cause changes in lung volume and capacity because of the changes in the geometry of the respiratory muscles, especially the diaphragm. In the seated position the expansion of the abdomen is similar to that of the rib cage; however, in the supine position the weight of the abdominal

Received 3 June 2014. Accepted 5 October 2014.

L. Silva and G. Fregonezi, Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.
J.M. Barcelar, C.S. Rattes, L.B. Sayão, C.A. Reinaux, S.L. Campos, and D.C. Brandão, Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
A. Aliverti, Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria, Politecnico di Milano, Milano, Italy.
A. Dornelas de Andrade, Av. Jornalista Aníbal Fernandes, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.
Corresponding author: Armêle Dornelas de Andrade (e-mail: armele@pq.cnpq.br).

Appl. Physiol. Nutr. Metab. 40: 1178–1183 (2015) dx.doi.org/10.1139/apnm-2014-0201

Published at www.nrcresearchpress.com/apnm on 22 October 2014.